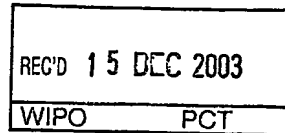


PCT/EP 03 / 09218
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EPO - Munich
83
14. Nov. 2003

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 102 38 980.2

Anmeldetag: 20. August 2002

Anmelder/Inhaber: SunGene GmbH & Co. KGaA, Gatersleben/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in
Blütenblättern von Pflanzen

IPC: A 01 H, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schäfer

A 9161
03/00
EDV-L

BEST AVAILABLE COPY

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Blütenblättern
von Pflanzen

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in Blüten-
10 blättern aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und
15 Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und
20 Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und
25 Shrimpszucht verwendet.

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in
30 biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise Haematococcus pluvialis oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

35 Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

Aus WO 00/32788 ist es bekannt, durch kombinierte Überexpression von Carotinoid-Biosynthesegenen und Antisense-Verfahren bestimmte
40 Carotinoidverhältnisse in Tagetespetalen zu beeinflussen.

WO 98/18910 beschreibt die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen eines Ketolase-Gens in Tabak.

2

WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase
5 aus Haematococcus.

Die in WO 98/18910 und WO 01/20011 offenbarten Verfahren liefern zwar genetisch veränderte Pflanzen, die in spezifischen Geweben einen Gehalt an Ketocarotinoiden aufweisen, weisen jedoch den
10 Nachteil auf, das die Höhe des Gehalts an Ketocarotinoiden und die Reinheit, insbesondere an Astaxanthin noch nicht zufriedenstellend ist.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein alternatives
15 Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Ketocarotinoiden aufweisen und den geschilderten
20 Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Pflanzen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in
25 Blütenblättern aufweisen.

Bis auf wenige Ausnahmen abgesehen, wie beispielsweise das Adonisröschen, enthalten Pflanzen und insbesondere die Blütenblätter, die auch Petalen genannt werden, zwar Carotinoide, aber
30 keine Ketocarotinoide. In der Regel weisen daher die Blütenblätter von Wildtyppflanzen keine Ketolase-Aktivität auf.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangspflanzen Pflanzen verwendet, die bereits als
35 Wildtyp in Blütenblättern eine Ketolaseaktivität aufweisen, wie beispielsweise das Adonisröschen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität in Blütenblättern.

40 Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,
45 β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

3

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

- Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird
10 somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge β -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt
15 mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

- 20 Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze verstanden.

- Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch ver-
25 änderte Pflanze oder beides verstanden werden.

- Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen die Pflanze oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-
30 Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität, und für die nachstehend beschriebene Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

- 35 Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

- 40 Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders
45 bevorzugt *Tagetes erecta*.

4

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcho-
- 10 lat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

- Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder
- 15 durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in die Pflanze.

- 20 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase wird erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung
- 25 der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

- 30 Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdsubstanzen
- 35 erfolgen.

- Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der Wildtyppflanze nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulator-
- 40 protein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

- 5 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Pflanze.
- 10 In den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor. In dieser Ausführungsform weist die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase,
- 15 auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine Ketolase, auf

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangspflanzen Pflanzen

- 20 verwendet, die als Wildtyp in Blütenblättern keine Ketolaseaktivität aufweisen, wie beispielsweise *Tomate*, *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida*, *Tagetes minuta*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri* und *Tagetes campanulata*.
- 25 In dieser, bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in Blütenblättern. Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze weist somit in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern auf
- 30 und ist somit vorzugsweise in der Lage, in Blütenblättern transgen eine Ketolase zu exprimieren.

- In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression
- 35 einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze.

- 40 Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

- Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können
- 45 beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

6

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

Haematoccus pluvialis, insbesondere aus *Haematoccus pluvialis* Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

15

Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

Aliccaligenes spec. (Accession NO: D58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 8),

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

30

Bradyrhizobium sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16).

Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 leicht auffinden.

45

7

Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 aus verschiedenen Organismen, deren
5 genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen er-
10 folgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory
15 Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles
20 ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

25 Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der
30 Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

35 Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

40

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

45 (iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

8

- (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder
- 5 (v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder
- 10 (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
- 15 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
- 20 (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder
- (ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder
- 25 (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder
- (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- 30 (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder
- (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, 35 enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

45

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der

9

Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin

10

(USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a micro-computer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

5

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

10 K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

Diagonals saved 5

- 15 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

25

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze ein.

- 35 In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in die Pflanze ein.

- Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und

11

Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- 5 In einer besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.
- 10 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, das die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspe-
- 15 zifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

Unter Pflanzen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Pflanzen verstanden, die als Wildtyp in Blütenblättern Chromoplasten aufweisen. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blü-

20 tenblättern zusätzlich Carotinoide, insbesondere β -Carotin, Zeaxanthin, Neoxanthin, Violaxanthin oder Lutein auf. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich eine Hydroxylase-Aktivität auf.

- 25 Unter Hydroxylase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,

30 β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

Inbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

- 35 Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

40 Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae,

45 Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae,

12

Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

- Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe
- 5 der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*,
- 10 *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Martia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders
- 20 bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.
- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase

30 verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

- 35 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.
- 40 Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.
- 45 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin oder

13

Cantaxantin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität
5 mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

10

Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von
15 Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Carotin in β -Carotin
20 umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. gebildete Menge β -Carotin verstanden.

25

Bei einer erhöhten β -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. die gebildete Menge β -Carotin erhöht.

30

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere
35 mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

40

Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono-
45 und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

14

- Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalyse, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

- 20 Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann

- 25 (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) in vitro bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma-protein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.

- 30 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

- 35 Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stroma-protein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 μ l Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

15

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

- 5 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder
10 von Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

- Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann
15 ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/
20 oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine ϵ -Cyclase in die Pflanze.

- Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase und/oder β -Cyclase wird erfindungsgemäß auch die
25 Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase verstanden.

- Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder β -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.
30

- Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der
35 endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

- 40 Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder β -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

16

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze.

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine β -Cyclase codiert, verwendet werden.

15

Bei genomischen Hydroxylase-bzw. β -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.

- 20 β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession
25 AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

Ein Beispiel für ein β -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, codierend eine β -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure:

- 30 SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20).

In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder β -Cyclase-Gen

- 35 vor.

In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase auf.

- 40 gene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase auf.
- 45 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gen Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder

17

eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene

lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO: 18 leicht auffinden.

15

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch

Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen

eingbracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code er-

hältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer,

bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

40

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion

von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten

18

mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweisen.

- 5 Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der β -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 20.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 19 in den Organismus ein.

35 Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al.

19

(1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen
5 die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität auf.

Unter ϵ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer ϵ -Cyclase verstanden.

10

Unter einer ϵ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen ϵ -Ionon-Ring zu überführen.

15 Unter einer ϵ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in δ -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter ϵ -Cyclase-Aktivität die in einer be-
20 stimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge δ -Carotin verstanden.

Bei einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit
25 durch das Protein ϵ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge δ -Carotin reduziert.

Unter einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschied-
30 liche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer ϵ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

35 Die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge, oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung
40 der ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer ϵ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen
45 vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von ϵ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der ϵ -Cyclase). Vorzugsweise wird die ϵ -Cyclase-Aktivität

20

(bzw. die ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder die ϵ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. des ϵ -Cyclase-Proteins oder der ϵ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die ϵ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben werden.

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nieselstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

21

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 5 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ϵ -Cyclase-dsRNA gegen ein ϵ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder
10 ein ϵ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- 15 b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ϵ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein ϵ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein ϵ -Cyclase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen,
20 c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 25 d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 35 f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 40 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem ϵ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes ϵ -Cyclase-Gen durch homologe
45 Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen ϵ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

22

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer ϵ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können.

Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen

- 5 Variante einer ϵ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer ϵ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem
- 10 Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der ϵ -Cyclase, des Transports der ϵ -Cyclase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines ϵ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfas-
- 15 sen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

- 20 a) Einbringen einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz (ϵ -Cyclase-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt

- 25 und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich
- 30 Bezug genommen.

Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß

- 35 den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

- 40 Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

23

Unter einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch ϵ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

5

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

10 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem

15 Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

20 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Unter dem Begriff " ϵ -Cyclase-Transkript" wird der transkripierte Teil eines ϵ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der ϵ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

25

Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise

30 gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw.

35 der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

40

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen

45 und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

24

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-dsRNA Teile des ϵ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die ϵ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ϵ -Cyclase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer ϵ -Cyclase bewirken.

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

25

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und

30

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

Zur Transformation der Pflanze mit einer ϵ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die ϵ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und

25

- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

- 5 Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die
10 Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

- "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der ϵ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch
15 eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines
20 ϵ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines ϵ -Cyclase-Gens.

- Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem ϵ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente
25 Verminderung der ϵ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von
30 der ϵ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die ϵ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von ϵ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen
35 leicht abgeleitet werden.

- Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines ϵ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in
40 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

- "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens

26

95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die ϵ -Cyclase-dsRNA

5

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-Gens, und

10

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

15 Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines

20

ϵ -Cyclase-Gens, und

b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

25

Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer ϵ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

30

SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase

35

SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase

40

SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase

45 SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

15

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

20

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

30 Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer ϵ -Cyclase gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

35

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

40 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit

45 dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

28

- c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

5

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

- Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

25

- Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer ϵ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor inseriert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

- Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

- b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-antisenseRNA)

- Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA

29

kodierend für das zu vermindernende ϵ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der ϵ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch
5 Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

Eine ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese
10 ϵ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der ϵ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken
15 oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die ϵ -Cyclase umfasst. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel
20 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. ϵ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert..

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskassetten enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für zumindest einen Teil einer ϵ -Cyclase, wobei besagte Nukleinsäuresequenz mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor in antisense-Orientierung funktionell verknüpft ist. In einer
30 besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ
35 ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktes oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

40 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer ϵ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines ϵ -Cyclase-Gens (z.B. einem ϵ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-
45 helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des ϵ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer

Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

In einer weiteren Ausführungsform kann die ϵ -Cyclase-antisenseRNA
5 eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res
10 15:6625-6641).

c) Einbringen einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

15 Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird
20 (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese
25 enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Stei-
30 necke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um
35 die mRNA eines zu vermindernden ϵ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257).
40 In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds,
45 Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant

31

Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden ϵ -Cyclases aufweisen 5 (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

10 d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

Die Expression einer ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden ϵ -Cyclase-Gens führen. Die Expression 15 von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen ϵ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc 20 Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist 25 nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in US 5,034,323.

Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz 30 realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38. Bevorzugt ist die ϵ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation der ϵ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen 35 kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

40 e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen ϵ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

Eine Verminderung einer ϵ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern 45 sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung ent-

32

- sprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616-3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).
- 15 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines ϵ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.
- 20 Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die ϵ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente
- 25 oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).
- 30 f) Einbringen von den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten
- Die ϵ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen ϵ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe
- 35 eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell SM et al. (1999) Plant J 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu vermindernenden ϵ -Cyclase mittels viraler Vektoren in die
- 40 Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6):937-46).

33

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein ϵ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 .

g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an ϵ -Cyclase-Genen

- 10 Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und
- 15 Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.)

- Die Verminderung der ϵ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder
- 20 -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Aus-
- 25 führungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines ϵ -Cyclasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das ϵ -Cyclase-Gen so ver-
- 30 ändert wird, dass die Funktionalität des ϵ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des ϵ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt
- 35 und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des ϵ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung
- 40 der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Ver-
- 45

34

fahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten ϵ -Cyclase selektioniert.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.
- Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).
- Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu vermindernenden Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden Marker-

35

protein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungs-
5 gemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährlei-
10 stenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden
15 Expressionskassette in Pflanzen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch
20 Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate
25 einer ϵ -Cyclase aufweisen.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

30 In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.
35

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Pflanzen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

40 Genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

45

36

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- 5 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine
10 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine
15 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine
20 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine
25 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

- Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen kann, wie
30 nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

- 35 Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern der Pflanzen angeschlossen.

- 40 Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

- Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blüten-
45 blättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie

37

beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt
5 beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phyto-
10 chemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon,
15 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

Die Ketocarotinoide fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in
20 Blütenblättern in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurinsäure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587-591).

25 Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der β -Cy-
30 clase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw. β -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von
35 anti- ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder ϵ -Cyclase-Inverted-Repaet-Nukleinsäuresequenz anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

40 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Re-
45 gulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

38

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

10

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts,

15 d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer
20 operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

25

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

30

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER),
35 im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

40 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

45

39

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

5

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294;

- 10 Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

- 15 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamyl-
20 alkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere
25 Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu

- 35 Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein
40 durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet
45 werden.

40

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

- 10 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966;
- 20 Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

- Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der
- 25 des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

- Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-
- 35 spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebe-spezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

40

- Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren
- 45 mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

41

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

- 5 Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

10

Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der AP3 Promoter aus Arabidopsis thaliana (siehe Beispiel 1).

15

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor oder der g-Zein Promotor.

- 20 Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

- 25 Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitu-

- 30 tive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen

- 35 blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine Ketolase.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise

- 40 einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise
- 45 in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. En-

42

quist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

5

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

- 10 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

- Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

- 25 Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

30 pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCGTACTCTTCTCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
35 TAAGGTCACCGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAACTGAGACTGCGGGA
TCC_BamHI

pTP10

- 40 KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCGTACTCTTCTCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTCACCGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAACTGAGACTGCGCTG
GATCC_BamHI

45

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCACTTTTCCGGCCTTAA
5 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCCTCCGCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGG
ATCC_BamHI

- Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das
10 Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isome-
rase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der
kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS)
aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P
(1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into
15 the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

- Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch her-
gestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus
synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen ent-
20 halten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten
verschiedener Organismen bestehen.

- Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleo-
tid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden.
25 Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der
höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten
interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

- Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene
30 DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu
erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest
und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die
Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente
Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- 35 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regio-
nen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker,
der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion die-
ser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker
40 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktions-
stellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatori-
schen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger
als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ
bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze
45 sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der
5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende
Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine

44

Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau
5 et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator
(Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopa-
line synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl
Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de
Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M,
10 van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-
DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3:
835-846).

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnitt-
15 stellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restrikti-
onsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,
Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Trans-
versionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-
repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

20 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-
back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können kom-
plementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung ge-
stellt werden.

25 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadeny-
lierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-
Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, ins-
besondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids
30 pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff)
oder funktionelle Äquivalente.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird
als Transformation bezeichnet.

35 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Re-
generation von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen
zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

40 Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Pro-
toplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-
Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die so-
genannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die
Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikro-
45 injektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium
vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispiels-
weise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in:

45

Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

5

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4

10 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte *Agrobakterien* können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer

15 *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusio-

20 nierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte *Agrobakterien* können dann in bekannter Weise zur Transformation von25 Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.30 Die Transformation von Pflanzen durch *Agrobakterien* ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten

35 Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

40 Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology

45

46

and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

- Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und
- 5 Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res.16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet
- 10 sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

15

- Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, das man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen Promotor und Nukleinsäuren
- 20 kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase in

25 Blütenblättern,

- A für den Fall, das die Wildtyppflanze bereits eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und
- 30 B für den Fall, das die Wildtyppflanze keine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht.

Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung

35 der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend

40 ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase durch Einbringen von Nukleinsäuren codierend eine Ketolase in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren codierend eine Ketolase.

45

47

Bevorzugte transgene Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität in den Blütenblättern aufweisen, enthalten, wie vorstehend erwähnt, mindestens ein transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

5

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im

10 erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Weiter bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren be-

15 schrieben.

Unter Pflanzen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Pflanzen verstanden, die als Wildtyp in Blütenblättern Chromoplasten auf-

20 weisen. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich Carotinoide, insbesondere β -Carotin, Zeaxanthin, Violaxanthin oder Lutein auf. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich eine β -Cyclase-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wild-

25 typ in den Blütenblättern zusätzlich eine Hydroxylase-Aktivität auf.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae,

30 Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

35

Die Erfindung betrifft daher insbesondere genetisch veränderte Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae,

40 Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae, oder Lamiaceae enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

45

48

Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Adonis, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, 5 Petunia, Geranium oder Tropaeolum, wobei die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.

Wie vorstehend erwähnt wird in bevorzugten transgenen Pflanzen 10 die Ketolase in Blütenblättern exprimiert, besonderes bevorzugt ist die Expression der Ketolase in Blütenblättern am höchsten.

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Blütenblätter 15 sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

20 Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- 25 und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

30 Die genetisch veränderten Pflanzen können auch als Zierpflanzen im Horticulture-Bereich verwendet werden.

Die genetisch veränderten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

35 Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber 40 auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die 45 erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

49

Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert,
5 ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

10 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

15 Beispiel 1:

Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm
20 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von
25 *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0.02 $CaCl_2 \times 2H_2O$; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l $FeSO_4 \times H_2O$) gewachsen war, wurden die Zellen
30 geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen
35 und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst.
40 Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines
45 cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach

50

Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

10 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 20 - 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

25 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	2 Minuten
30	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend

35 aus der gesamten Primärsequenz codiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

40 Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abbildung 3 und 4, Sequenzvergleiche).

45

51

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus plu-*
5 *vialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

10 Beispiel 2:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus plu-*
vialis Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem
N-terminus codiert

15 Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

20

Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

25 Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus plu-*
vialis (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haema-*
30 *tococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

35

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 40 - 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)
- 45 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

52

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
5		53°C	2 Minuten
		72°C	3 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein codiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürzten N-Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

30

Beispiel 3:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert.

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pJKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15 (SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'Region (Nucleotide 40 bis 59) und einer myc-Tag codierenden 5'Region (Nucleotide 1 bis 39).

45

53

Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 µg pGKETO2 PlasmidDNA
- 0.1 µg PR15 (SEQ ID NO: 32)

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 11.5 µl pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 15 - 2U Klenow Enzym

- Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus plu-*
vialis (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz
und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase
20 chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung
eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines
antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 25 Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein
mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, erfolgte in einem
50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 30 - 1 µl einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 35 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | | |
|----|-----|------|------------|
| 40 | 1X | 94°C | 2 Minuten |
| | 35X | 94°C | 1 Minute |
| | | 53°C | 1 Minute |
| | | 72°C | 1 Minute |
| | 1X | 72°C | 10 Minuten |

45

54

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein codiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem
5 rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380)
15 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine
20 translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalen myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst
25 pJKETO4.

Beispiel 4:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum*
30 und *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell
35 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (W002/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 5A, Konstruktkarte). In der Abbildung 5A beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transit-

55

peptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO2* (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

5

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO3 wurde das 2.7 Kb bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO3 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO3* (985 bp) die um 14 N-terminale Aminosäuren verkürzte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

15

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO4 wurde das 2.8 Kb *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO4 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 7, Konstruktkarte). In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter ((747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO4* (1038 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

25

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

30

- Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO2 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5B, Konstruktkarte). In der Abbildung 5B beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO2* (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

40

Beispiel 5A:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

45

56

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version
5 AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus
10 *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

15 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20
- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
 - 0.25 mM dNTPs
 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
 - 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)

25

 - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
 - 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 30
- | | | |
|-------|------|------------|
| 1X | 94°C | 2 Minuten |
| 35X | 94°C | 1 Minute |
| | 50°C | 1 Minute |
| | 72°C | 1 Minute |
| 35 1X | 72°C | 10 Minuten |

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

- 40
- Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3
45 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die

57

tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR
5 unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200
bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern
PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region
9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34) und PR10
(SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

10

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die
Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Pro-
15 moters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen
enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 20 - 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
- 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10
SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 25 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
30	35X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

- 35 Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine
Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und
A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende
Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des
AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 dele-
40 tiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing
(langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifi-
kate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in
dem enthalten war:

45

58

- 0.5 µg A7/9 Amplifikat
- 0.25 µg A8/10 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem
5 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µg A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 10 - 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen
15 Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20 Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 25 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

30

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
35		50°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region
45 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die

59

Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII
5 Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das
10 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

15 Zur Herstellung einer Expressionskassetten pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst
20 pJAP3PKETO4.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der
25 Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 8A, Konstruktkarte). In der Abbildung 8A beinhaltet Fragment AP3P den
30 modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal
35 von CaMV.

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO4 wurde das 2.8 KB SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO4 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 9, Konstruktkarte). In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment AP3P den
40 modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO4 (1038 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment term (761 Bp) das
45 Polyadenylierungssignal von CaMV.

60

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

5

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8B, Konstruktkarte). In der Abbildung 8B beinhaltet Fragment AP3P den

10 modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO2* (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV

15

Beispiel 5B:

Amplifikation einer chimären cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einer heterologen 5' nicht translatierten Region (5'UTR) beinhaltet, und Herstellung eines

20 Expressionsvektors zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase ohne Verwendung eines heterologen Transitpeptides in *Lycopersicon esculentum*.

Die cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm

25 192.80) folgend auf eine heterologe "5'nicht-translatierte Region" (5'UTR) enthält, wurde mittels PCR hergestellt.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einer "5'nicht-translatierten Region"

30 (5'UTR) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus dem Plasmid pGKETO2 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR142 SEQ ID NO: 78) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

35 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des Fragmentes, das sowohl für ein Ketolase Protein codiert als auch eine heterologe 5'UTR Region enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten

40 war:

- 10 ng des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 45 - 0.2 mM PR142 (SEQ ID NO: 78)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)

61

- 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	2 Minuten
		72°C	3 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

10

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR142 resultierte in einem 1.1 KB Fragment, das eine heterologe 5'UTR Region, gefolgt von der kodierenden Region für ein Ketolase, enthält (SEQ ID NO: 79)

- 15 Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klones pTA-KETO5 mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine Sequenz (SEQ ID NO: 79), die [abgesehen vom 5'Terminus, der identisch zu pJIT117 ist (Guerineau et al. 1988, 20 Nucl. Acids Res. 16: 11380)], identisch zur Sequenz SEQ ID NO: 22 ist. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAP3PKETO2 (Beispiel 5A) verwendet.

- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 0.3 KB HindIII Frag-
25 mentes aus pTA-KETO5 und Ligierung in den HindIII-geschnittenen Vektor pJAP3PKETO2. Der Klon, der den AP3P Promoter, gefolgt vom 5'UTR aus pJIT117 und der kompletten kodierenden Sequenz für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase enthält, heisst pJAP3PKETO5.

- 30 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter Kontrolle des Promoters AP3P (siehe Beispiel 5A) und des 5'UTRs aus pJIT117. Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Trans-
35 formation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO 02/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO5 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO5 mit dem SacI-XhoI geschnit-
40 tenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 21, Konstruktkarte). In der Abbildung 21 beinhaltet Fragment AP3P den AP3P-Promoter (747 bp), Fragment 5'UTR die 5'UTR Sequenz aus pJIT117 (30 bp), Fragment KETO5 (1.0 kb) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyade-
45 nylierungssignal von CaMV.

62

Beispiel 6:

Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach
5 der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843-847). Für die Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.

Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen
10 und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant 15, 473-) mit 2 % Saccharose, pH 6.1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C bei wenig Licht (20 bis 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen
15 wurden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 bis 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3% Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt wurde. Die Tomatenzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem
20 Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobakterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3KETO2, pS3KETO3, pS3AP3PKETO5 bzw. pS3AP3KETO2 transformiert. Von den einzelnen mit den Binärvektoren pS3KETO2,
25 pS3KETO3 bzw. pS3KETO2 transformierten Agrobakterium-Stämmen wurde jeweils eine Übernachtskultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 Grad Celsius kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3 % Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte
30 von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück
35 gelegt.

Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3 % Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regenera-
40 tion bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 bis 100 µE, Lichtrhythmus 16 h/8 h) aufbewahrt. Alle zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 + 3 % Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin,
45 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.

63

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS3KETO2 wurde erhalten: cs13-8, cs13-24, cs13-30, cs13-40.

5

Mit pS3KETO3 wurde erhalten: cs14-2, cs14-3, cs14-9, cs14-19.

Mit pS3AP3PKETO2 wurde erhalten: cs16-15, cs16-34, cs16-35, cs16-40.

10

Tabelle 1 zeigt das Erscheinungsbild der Blütenblätter der erfindungsgemäß genetisch veränderten Tomatenpflanzen. Die Analyse der Ketocarotinoide erfolgte wie nachstehend beschrieben.

15 Tabelle 1

Pflanze	Blütenfarbe	Astaxanthin	Adonixanthin
Control	gelb	nein	nein
Control	gelb	nein	nein
CS13-8	orange	ja	ja
CS13-24	orange	ja	ja
CS13-30	orange	ja	ja
CS13-40	orange	ja	ja
CS14-2	orange	ja	ja
CS14-3	orange	ja	ja
CS14-9	orange	ja	ja
CS14-19	orange	ja	ja
CS16-15	orange	ja	ja
CS 16-34	orange	ja	ja
CS 16-35	orange	ja	ja
CS 16-40	orange	ja	ja

Beispiel 7:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

- 35 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20-200 µE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 µE, für 4 bis 40 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm²

- 45 werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

64

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt bar oder pat) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann

5 wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 %

10 Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD_{600} von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension

15 wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension

20 erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die

25 Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 $\mu\text{Mol/m}^2 \times \text{sec}$, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend

30 werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet.

35 Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

40

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit

45 Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA_3 , zur Bewurzelung über-

65

tragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden.
10 Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
15
- Die Zugabe von AgNO_3 (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
20
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 25 • Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

30 Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2,
mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2
35 und cs19-3.

Beispiel 8

Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

40 Beispiel 8.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

66

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörkert und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 %
5 Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 µl Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck)
10 in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausge-
15 kratzt.

Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 µl Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

20 Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung
25 der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen CS13-8, cs13-24, cs13-30, cs13-40, cs14-2, cs14-3, cs14-9, cs14-19 wurden gemörkert und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide wurden
30 mittels TLC aufgetrennt. In beiden Linien konnten Mono- und Diester von Ketocarotinoiden detektiert werden; die Monoester waren in deutlich geringerer Konzentration als die Diester vorhanden.

35 HPLC-Analysen ergaben, das Diester der Xanthophylle (gelbe Bande) und der Ketocarotinoide (rote Bande) vorlagen; die Diester der Ketocarotinoide lagen in etwa 10mal höherer Konzentration vor als die Monoester (Abbildung 10).

40 Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen cs16-15, cs16-34, cs16-35, cs16-40, die den AP3-Promotor tragen, wurden gemörkert und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide wurden mittels TLC aufgetrennt. Monoester von Ketocarotinoiden konnten nicht oder nur in äußerst geringer Konzentration nachgewiesen werden. Diester
45 der Ketocarotinoide waren in gleicher Menge wie in Linien CS13

67

und CS14 vorhanden. Diester der Xanthophylle waren mengenmäßig wenig verändert im Vergleich zu Kontrollpflanzen.

Abbildung 9A zeigt ein Dünnschicht-Chromatogramm. Die Carotinoide aus Tomatenpetalen wurden mit Aceton extrahiert und mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Im Vergleich zu Kontroll-Extrakten konnten zusätzliche Carotinoidbanden [(1), (2) und (3)] in Petalen transgener Tomatenpflanzen detektiert werden.

Abbildung 10 zeigt ein HPLC-Diagramm. Die zusätzlichen Carotinoidbanden in Petalen transgener Tomatenfrüchte (siehe (1-3) in Abbildung 9A) wurden extrahiert, mit Aceton eluiert und mittels HPLC analysiert. (1) wurde als Monoester, (2) und (3) wurden als Diester identifiziert.

15

Beispiel 9

Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

20 Allgemeine Arbeitsvorschrift

Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 µl; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 µl Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0,75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 µl Cholesterol-Esterase (Stammlösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200 µl Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 0,35 g Na₂S₂O₄·10H₂O und 500 µl Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na₂S₂O₄·10H₂O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 µl Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

Isolierte Ketocarotinoidester (Mono- und Diester) der Linien CS13, CS14 und CS16 wurden mit Cholesterol-Esterase hydrolysiert und die freigesetzten Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt. Identifizierung der Carotinoide erfolgte aufgrund von Retentionszeit und Spektrum im Vergleich zu Carotinoid-Standards. Mono- und

68

Diester enthalten Astaxanthin in hoher Konzentration (90%) und Adonixanthin in geringer Konzentration (10%).

(siehe Tabelle und Abbildungen)

- 5 Abbildung 11 zeigt ein HPLC-Diagramm. Die eluierten Ester aus Beispiel 9 (Abbildung 10) wurden enzymatisch hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte mittels HPLC analysiert. Sowohl Mono- als auch Diester enthalten Astaxanthin als Hauptcarotinoid sowie Adonixanthin in geringer Konzentration.

10

Beispiel 10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

15

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion

- 20 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidenti-

- 25 sches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

- 30 Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

35

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz,

- 40 in dem enthalten war:

- 1 µl genomischer DNA aus *A. thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 45 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)

69

- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5		
	1X	94°C 2 Minuten
	35X	94°C 1 Minute
		50°C 1 Minute
		72°C 1 Minute
10	1X	72°C 10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters codieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 40 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 45 - 28.8 µl Aq. Dest.

70

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
5	50°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

- Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine
- 10 Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing
- 15 (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A7/9
- 20 - 0.25 µg A8/10

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 17.6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
 - 2 µl 1X Klenow Puffer
 - 2U Klenow Enzym

30

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

35

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

40

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)

45 - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)

- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

71

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
5	50°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10

- 10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die
- 15 interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII

- 20 Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält

- 25 wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

- 30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 35
- 1 µl p35SGUS INT
 - 0.25 mM dNTPs
 - 0.2 µM PR40 (SEQ ID NO: 54)
 - 0.2 µM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 40
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
 - 28.8 µl Aq. Dest.

72

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
5	53°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem
10 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das
Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen)
kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen
dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die
identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor
15 p35SGUS INT.

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P
(oben beschrieben).

20 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp SalI-BamHI
Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem SalI-BamHI
geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des
Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das
3'Ende des *rbcs* Transitpeptides enthält, heisst pJAI1 und ist ge-
25 eignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression
von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

In der Abbildung 12 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten
AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcs* das *rbcs* Transitpeptid aus
30 Erbse (204 bp), Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-
Gens ST-LS1, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungs-
signal von CaMV.

Beispiel 11

35 Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die
blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in
Tagetes erecta (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase
cDNA)

40 Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-
Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde
mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta*
cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42
SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43
45 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der
Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus

73

138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von Tagetes wurden
5 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß
überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenom-
men. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert.
Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige
Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt
10 und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem
Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das
Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit
1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschlie-
ßend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photome-
15 trisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA
für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und
mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia
Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense
spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

20

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die fol-
genden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die
25 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in
einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 30 - 0.2 µM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 µM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

35

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die
5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte
in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 40 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 µM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 45 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

74

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
5 35X	94°C	1 Minute
	58°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

- 10 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

- Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

- Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

- Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

- Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierung

75

gen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

5

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

10

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (W002/00900).

15

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkarte).

- 20 In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor

- 30 tor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkarte).

In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- 40 Beispiel 12

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

45

76

Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46
5 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47
SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

10

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel 11 beschrieben.

Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel 11 unter Verwendung
15 des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

20

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.25 mM dNTPs

- 0.2 µM PR46 (SEQ ID NO: 60)

- 0.2 µM PR47 (SEQ ID NO: 61)

- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)

30 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)

- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte
35 in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.25 mM dNTPs

- 0.2 µM PR48 (SEQ ID NO: 62)

40 - 0.2 µM PR49 (SEQ ID NO: 63)

- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)

- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)

- 28.8 µl Aq. Dest.

45

77

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
5 35X	94°C	1 Minute
	58°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

10 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

15 Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abge-
20 sehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp
25 PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI4. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwi-
30 schen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor
35 pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Re-
40 gion der Epsilon-Cyclase.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung
45 des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus

78

pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 15, Konstruktkarte).

In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten
5 AP3P Promoter (771 bp), Fragment 3sense die 3'region der Epsilon
cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Frag-
ment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment
3anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435
bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Po-
10 lyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 13

Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

15 Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase
Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, In-
verse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:
10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463)
unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tage-*
20 *tes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem
25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend
auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase reli-
25 giert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51
(SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment herge-
stellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-
Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des
Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs
30 der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 16).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter
35 anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält,
erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 40 - 0.2 µM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 0.2 µM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

45

79

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
5 35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

- 10 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 16).

- Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangen-
20 prinz.

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

25

Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 30 - 0.2 mM jedes dNTPs
- 0.2 µM PR60 (SEQ ID NO: 66)
- 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- 35 - mit Aq. Dest. auf 20 µl aufgefüllt

- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

- 40 Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | |
|-------|--|
| 1X | 93°C: 1 Minute, 95°C: 1 Minute |
| 5X | 94°C: 30 Sekunden, 62°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten |
| 45 1X | 94°C: 30 Sekunden, 25°C: 3 Minuten, ramp to 72°C in 3 Minuten, 72°C: 2.5 Minuten |
| 15X | 94°C: 10 Sekunden, 68°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten; |

80

94°C: 10 Sekunden, 68°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;

94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten

1X 72°C: 5 Minuten

5 Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 10 - 0.8 mM dNTP
- 0.2 µM PR61 (SEQ ID NO: 67)
- 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- 15 - mit Aq. Dest. auf 21 µl aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 20 12X 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
1X 72°C: 5 Minuten

25 Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 30 - 0.8 mM dNTP
- 0.2 µM PR63 (SEQ ID NO: 68)
- 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 35 - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 100 µl aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

40

45

81

20X 94°C: 15 Sekunden, 29°C: 30 Sekunden, 72°C: 2 Minuten
1X 72°C: 5 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in
5 einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoter-
fragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 17).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden
in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert.
10 Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz
SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz
SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und
repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten
Tagetes erecta Linie Orangenprinz.

15

Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID NO: 45) des
Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert
wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung
der IR Konstrukte verwendet.

20

Beispiel 14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die
blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tage-*
tes erecta (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cy-
25 clase cDNA).

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus
Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte
unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezi-
30 fischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 10) oder
des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO:
AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein
Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung
(Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-
35 Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-
Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 10)
mit einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von
40 Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 13) und der Primer
PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer
PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

45

82

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem
5 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 10 - 0.2 µM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

15 Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 20 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 0.2 µM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | | |
|----|-----|------|------------|
| 30 | 1X | 94°C | 2 Minuten |
| | 35X | 94°C | 1 Minute |
| | | 53°C | 1 Minuten |
| | | 72°C | 1 Minuten |
| | 1X | 72°C | 10 Minuten |

35

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

- 40 Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abge-
- 45 sehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines

83

Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp
5 PR124-PR126 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor
pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI ge-
schnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoter-
fragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43. Durch
die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promo-
10 ters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp
PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-
BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen
15 Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment
in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Li-
gation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron
und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

20 Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette
unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfrag-
ment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standard-
methoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77)
und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde
25 in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzie-
rungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13
und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz.
Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvek-
tor cs44 verwendet.

30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII
Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII ge-
schnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle
des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.

35 Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette
unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des
AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung
an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in
40 cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter
Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifi-
kat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert.
Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur
Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon
45 pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expres-
sionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

84

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp SalI-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.

5

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

10

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 18, Konstruktkarte). In der Abbildung 18 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771

15 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

20 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 19, Konstruktkarte).

In der Abbildung 19 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter 25 (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

30 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CAI7 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 20, Konstruktkarte)

In der Abbildung 20 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter 35 (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das 40 Fragment AP3P das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Ori-

entierung.

Beispiel 15

Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen mit reduzierter ϵ -Cyclase-Aktivität

45

85

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C / 20 bis 200 µE / 5 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 µE, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch 10 entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Der Agrobakterium tumefaciens Stamm EHA105 wurde mit dem Binär- 15 plasmid pS5AI3 transformiert. Die Anzucht des transformierten A. tumefaciens Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 20 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakterien-suspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

25 Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit 30 Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die 35 Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 µMol/m² x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, 40 bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des 45 Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber

86

auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

- Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der
- 5 Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließ- schließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA₃, zur Bewurzelung über-
- 10 tragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- 15
- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive
- 20
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- 25
- Die Zugabe von AgNO₃ (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- 30
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 35
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

- Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden
- 40 mit dem Expressionskonstrukt pS5AI3 folgende Linien erhalten:

CS30-1, CS30-3 und CS30-4

87

Beispiel 16:

Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen mit reduzierter ϵ -Cyclase-Aktivität

5 Das Blütenmaterial der transgenen Tagetes erecta Pflanzen aus Beispiel 15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörserst und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 μ l). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 μ l Aceton resuspendiert.

10

Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [ug/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des " β -Carotin-Weges", wie beispielsweise β -Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des " α -Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

30

Tabelle 2

Pflanze	Lutein	β -Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweisen.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Pflanzen verwendet, deren Blütenblätter als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität in Blütenblättern im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Pflanzen verwendet, deren Blütenblätter als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern im Vergleich zum Wildtyp verursacht.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blütenblättern transgen eine Ketolase exprimieren.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.
- 40 8. Verfahren nach Anspruch 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase
- 45 aufweist.

2

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 einbringt.
10. Verfahren nach Anspruch 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 einbringt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blüten-spezifischen Promotors erfolgt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β -Cyclase-Aktivität aufweisen.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens einer der Nukleinsäuren, mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze einbringt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die

3

Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.

5

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 einbringt.

10 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt die eine β -Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-

15

leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20 aufweist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 19 ein-

20

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Hydroxylase und/oder β -Cyclase aufweisen.

25

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der Hydroxylase und/oder β -Cyclase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.

30

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

35 24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren erreicht:

- 40 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewähr-

45

leistenden Expressionskassette in Pflanzen,

4

- c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 5 d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 10 e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 15 f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen in Pflanzen.
- 20
25. Verfahren nach Anspruch 24, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- 25
- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 30
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder
- 35 das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine ϵ -Cyclase enthält.
27. Verfahren nach Anspruch 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer ϵ -Cyclase aufweisen.
- 40
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 24, Ausführungsform a) und/oder
- 45

5

der Antisense-Sequenzen gemäß Anspruch 24, Ausführungsform b) unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze verwendet, die in Blütenblättern Chromoplasten aufweist.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Blütenblättern der Pflanzen isoliert.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

6

34. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine Ketolase.
- 5 35. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine Ketolase.
36. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend
- 10
- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und
- 15
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.
37. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend
- 20
- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-Gens, und
- 25
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.
- 30 38. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 36, wobei die aus dem ϵ -Cyclase-Transkript ableitbare cDNA-Sequenz durch SEQ ID NO: 38 beschrieben ist.
39. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 37, wobei die
- 35 Nukleinsäuresequenz des Promotorbereichs des ϵ -Cyclase-Gens durch SEQ ID NO: 47 beschrieben ist.
40. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach einem der Ansprüche 38 bis 40, wobei "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang
- 40 kovalent in Form eines invertierten Repeats miteinander verbunden sind.
41. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor eine Nukleinsäuresequenz transkribierend ein
- 45

7

doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 36 bis 40.

42. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 41, wobei der
5 Promotor ein blütenspezifischer Promotor ist.
43. Genetisch veränderte Pflanze, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase in Blütenblättern,
- 10 A für den Fall, dass die Wildtyppflanze bereits eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und
- B für den Fall, dass die Wildtyppflanze keine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht.
15
44. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der
20 Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
45. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der
25 Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.
46. Genetisch veränderte Pflanze, die in den Blütenblättern Chromoplasten aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass die
30 genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase enthält.
47. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 43 bis
35 46, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze erhöht.
- 40 48. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 43 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich die ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze reduziert.
- 45 49. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 43 bis 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzenfamilien Ranunculaceae, Berberidaceae,

8

- Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.
50. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 49, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, oder Tropaeolum oder Adonis.
51. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 43 bis 50, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketolase in Blütenblättern exprimiert wird.
52. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 43 bis 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionsrate einer Ketolase in Blütenblättern am höchsten ist.
53. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 43 bis 52 als Zierpflanzen oder als Futter- und Nahrungsmittel.
54. Verwendung der Blütenblätter der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 43 bis 52 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.
55. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen gemäß Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Blütenblättern
von Pflanzen

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in
10 Blütenblättern aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

15

20

25

30

35

40

45

Abbildung 1: Biosyntheschema von Carotinoiden in Tomatenblüten

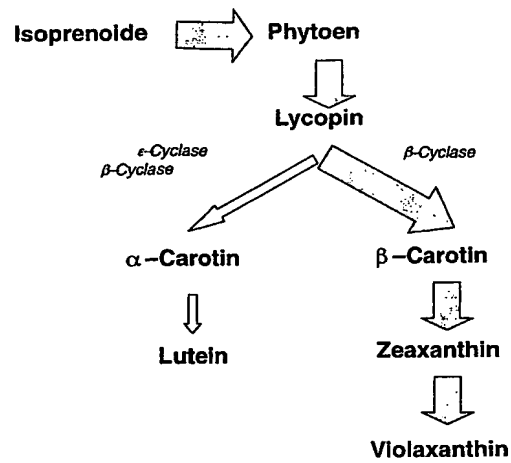


Abbildung 2: Biosyntheschema von Astaxanthin in genetisch veränderten Blüten

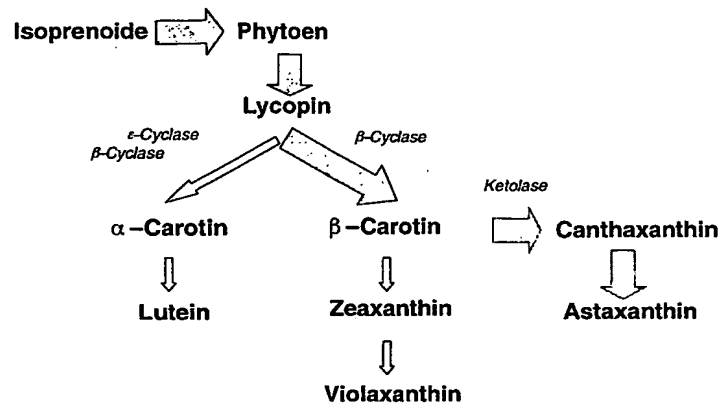


Abbildung 3: Nukleotidsequenzvergleich

```
KETO2.seq ATCCACCTAGCACCGACAGTAATGTTGGACCACTTACCGAAGCCCTGAGCCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTCCAGCCACCTCTGACGTGTTCC 100
X86782.seq ATCCACCTAGCACCGACAGTAATGTTGGACCACTTACCGAAGCCCTGAGCCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTCCAGCCACCTCTGACGTGTTCC 100

KETO2.seq GTACATGCGCGACCCAGTACTCCCTTCGGTCAGAGGAGTCAGACCGCGCGCGCGCGGACTGAAGAATGCCACAAAGCCACCACTTCGGACACAAAGCG 200
X86782.seq GTACATGCGCGACCCAGTACTCCCTTCGGTCAGAGGAGTCAGACCGCGCGCGCGGACTGAAGAATGCCACAAAGCCACCACTTCGGACACAAAGCG 200

KETO2.seq CATCACAATGCCCTAGCTGTCATGGCTCCTGGCGCGAGTGTCTCCACCCCATTTTCAAATCAAGCTTCGGACCTCCTTCGACCACTGCACCTGG 300
X86782.seq CATCACAATGCCCTAGCTGTCATGGCTCCTGGCGCGAGTGTCTCCACCCCATTTTCAAATCAAGCTTCGGACCTCCTTCGACCACTGCACCTGG 300

KETO2.seq CTGCGCGTGTGAGTCCACACCTCAGCTGGTTAGCGGCACGACGCTCCTCCACATGGTGTAGTATCTTTGTCTCGAGTTCCTGTACACAGGCC 400
X86782.seq CTGCGCGTGTGAGTCCACACCTCAGCTGGTTAGCGGCACGACGCTCCTCCACATGGTGTAGTATCTTTGTCTCGAGTTCCTGTACACAGGCC 400

KETO2.seq TTTTATCACCAGCCATGATGCTATGCATGCCACCATGCCATGAGAAACAGCCAGCTTAATGACTTCTTGGCAGAGTATGCATCTCCTGTAGCCCTG 500
X86782.seq TTTTATCACCAGCCATGATGCTATGCATGCCACCATGCCATGAGAAACAGCCAGCTTAATGACTTCTTGGCAGAGTATGCATCTCCTGTAGCCCTG 500

KETO2.seq GTTTGATTACACATGCTTCACCGCCAAAGCATTTGGGACCCACAAACACACTGGGAGGTGGGCAAGGAGCTGACTTCACAGCGGAAAGCCCTGCCATT 600
X86782.seq GTTTGATTACACATGCTTCACCGCCAAAGCATTTGGGACCCACAAACACACTGGGAGGTGGGCAAGGAGCTGACTTCACAGCGGAAAGCCCTGCCATT 600

KETO2.seq GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGGATGTGGCAGTTTGGCGCGCTGGCATGTGGAGCGGTGTCATGACCTCCTGGGTGGCGAA 700
X86782.seq GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGGATGTGGCAGTTTGGCGCGCTGGCATGTGGAGCGGTGTCATGACCTCCTGGGTGGCGAA 700

KETO2.seq TGGGAACTGCTGGTGTTCATGCGCGCGCGCGCGCATGCTGTGCGCGCTTGGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGCCCCACAAGCCCTGAGCCTGGCGC 800
X86782.seq TGGGAACTGCTGGTGTTCATGCGCGCGCGCGCGCATGCTGTGCGCGCTTGGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGCCCCACAAGCCCTGAGCCTGGCGC 800

KETO2.seq CCGGTCAAGCTCTTTCACCAAGCGTCATGAATCGTGGAGTGGGCACTAGCCAGCGGTGGGACCTGCTCAGCTTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG 900
X86782.seq CCGGTCAAGCTCTTTCACCAAGCGTCATGAATCGTGGAGTGGGCACTAGCCAGCGGTGGGACCTGCTCAGCTTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG 900

KETO2.seq CACTGGGACCAACAGCCCTGGCGCTTTGGCGCGCTGGTGGGAGCTGGCCAACTGGCGCGCGCTGTCTGGCGGAGGTCTGGTTCCTGCTAG 990
X86782.seq CACTGGGACCAACAGCCCTGGCGCTTTGGCGCGCTGGTGGGAGCTGGCCAACTGGCGCGCGCTGTCTGGCGGAGGTCTGGTTCCTGCTAG 990
```

Abbildung 4: Proteinsequenzvergleich

KETO2.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
X86782.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
KETO2.pro	RPGLKNAYKPPPSDTKGITMALAVIGSWAAVFLHAIFQIKLPTSLDQLHW	100
X86782.pro	RPGLKNAYKPPPSDTKGITMALRVIGSWAAVFLHAIFQIKLPTSLDQLHW	100
KETO2.pro	LPVSDATAQLVSGSSSLHLHVVFVLEFLYTGLFITTHDAMHGTIAMRN	150
X86782.pro	LPVSDATAQLVSGTSSLLDI VVFVLEFLYTGLFITTHDAMHGTIAMRN	150
KETO2.pro	RQLNDFLGRVCI SLYAWFDYNMLHRKHWEHHNHTGEVGKDPDFHRGNPGI	200
X86782.pro	RQLNDFLGRVCI SLYAWFDYNMLHRKHWEHHNHTGEVGKDPDFHRGNPGI	200
KETO2.pro	VPWFASFMS SYMSMWQFARLAWWTVVMQLLGAPMANLLVFMAAAPILSAF	250
X86782.pro	VPWFASFMS SYMSMWQFARLAWWTVVMQLLGAPMANLLVFMAAAPILSAF	250
KETO2.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQASDLVSFLT CYHF DL	300
X86782.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQASDLVSFLT CYHF DL	300
KETO2.pro	HWEHHRWPFAPWWELPNCRRLSGRGLVPA	329
X86782.pro	HWEHHRWPFAPWWELPNCRRLSGRGLVPA	329

Abbildung 5A: Konstrukt zur Überexpression der Ketolase (β -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt)

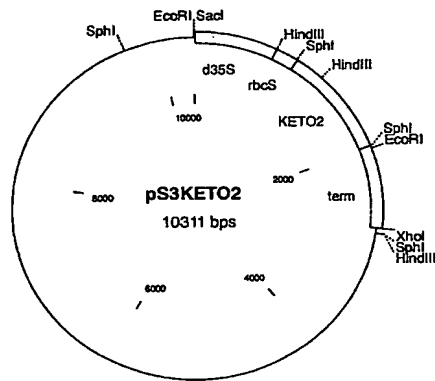


Abbildung 5B: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase (β -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tagetesttransformationskonstrukt)

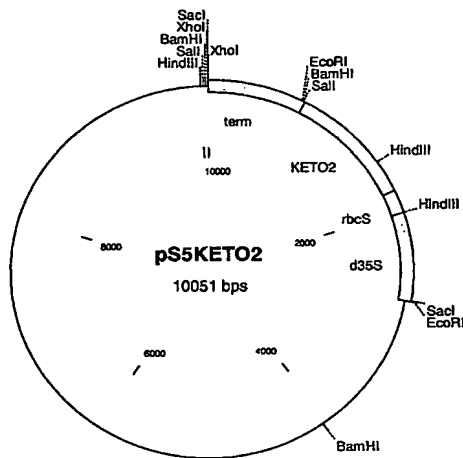


Abbildung 6: Konstrukt zur Überexpression des N-terminal verkürzten Ketolase (β -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters.

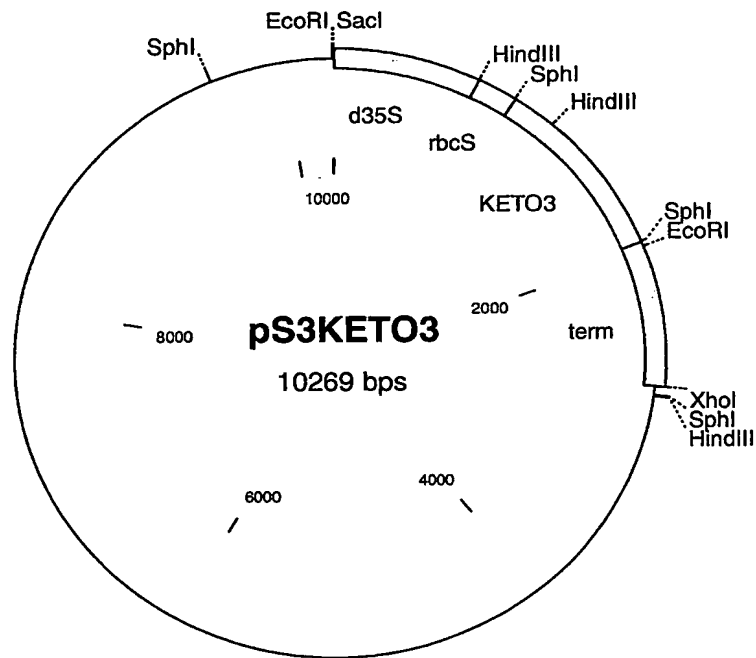


Abbildung 7: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase (β -C-4-Oxy-
genase) Protein aus *H. pluvialis* mit rbcS Transit-
peptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter
Kontrolle des d35S-Promoters.

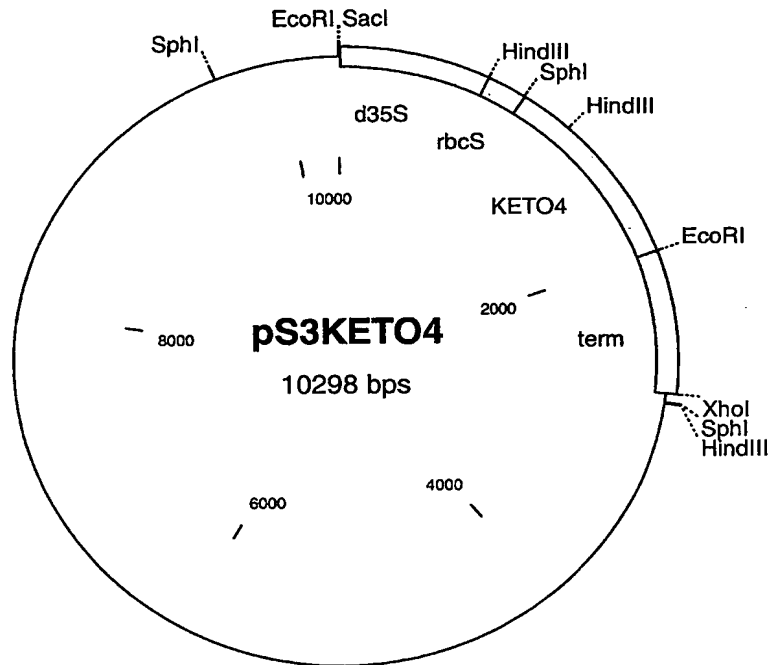


Abbildung 8A: Konstrukt pS3AP3PKETO2 zur Überexpression des Ketolase (β -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt).

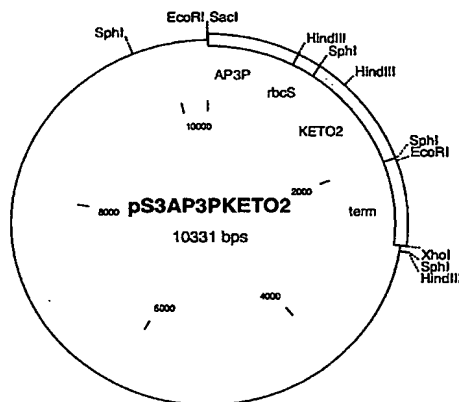


Abbildung 8B: Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase (β -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Zielselektionskonstrukt).

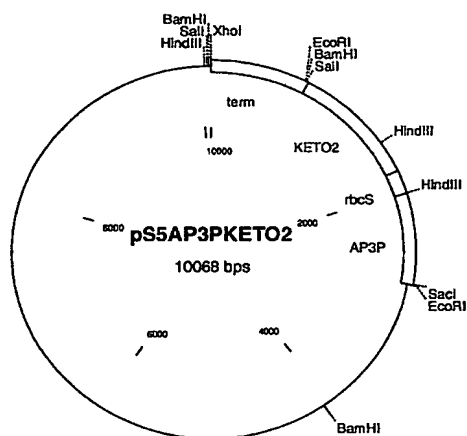


Abbildung 9: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase (β -C-4-Oxy-
genase) Protein aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transit-
peptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter
Kontrolle des AP3P-Promoters.

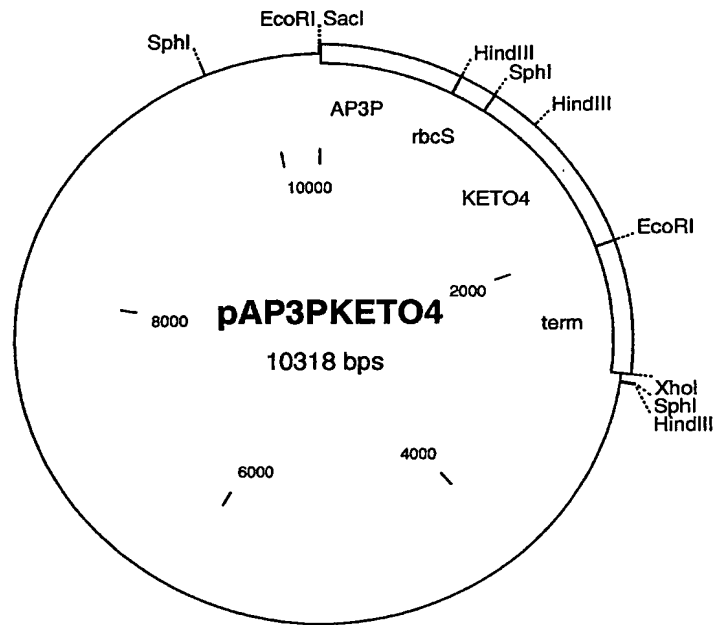


Fig. 10

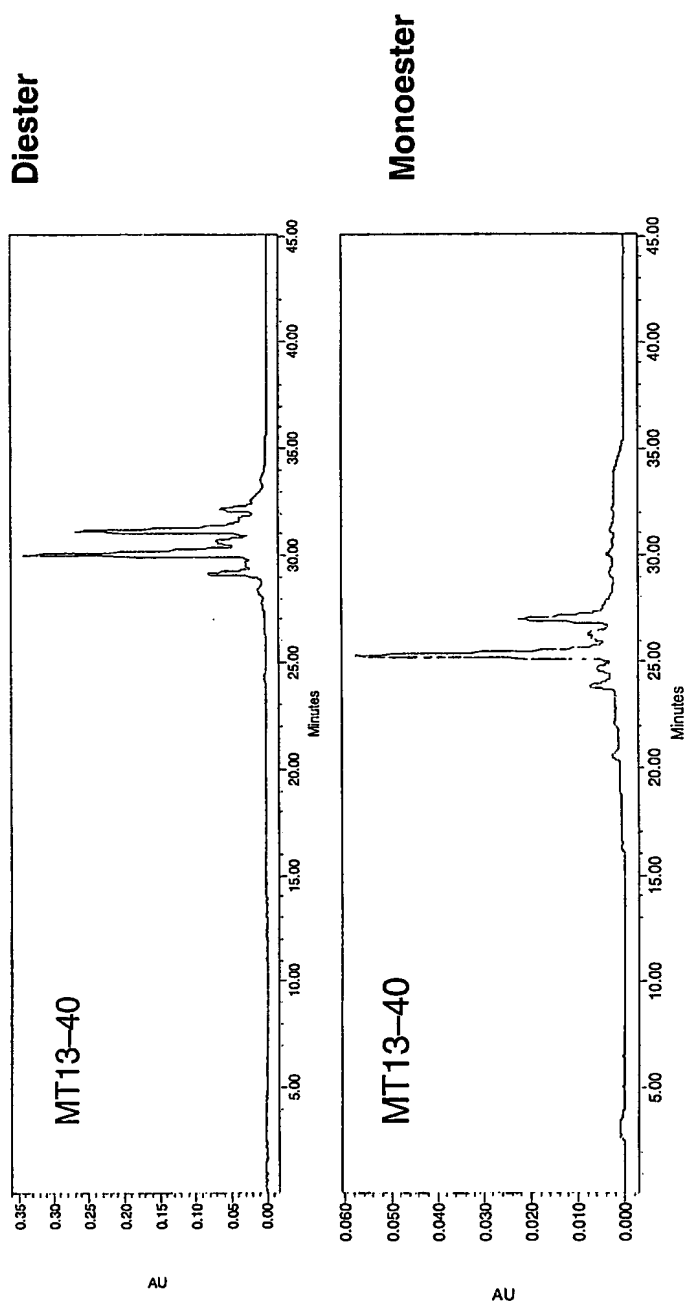


Fig. 11

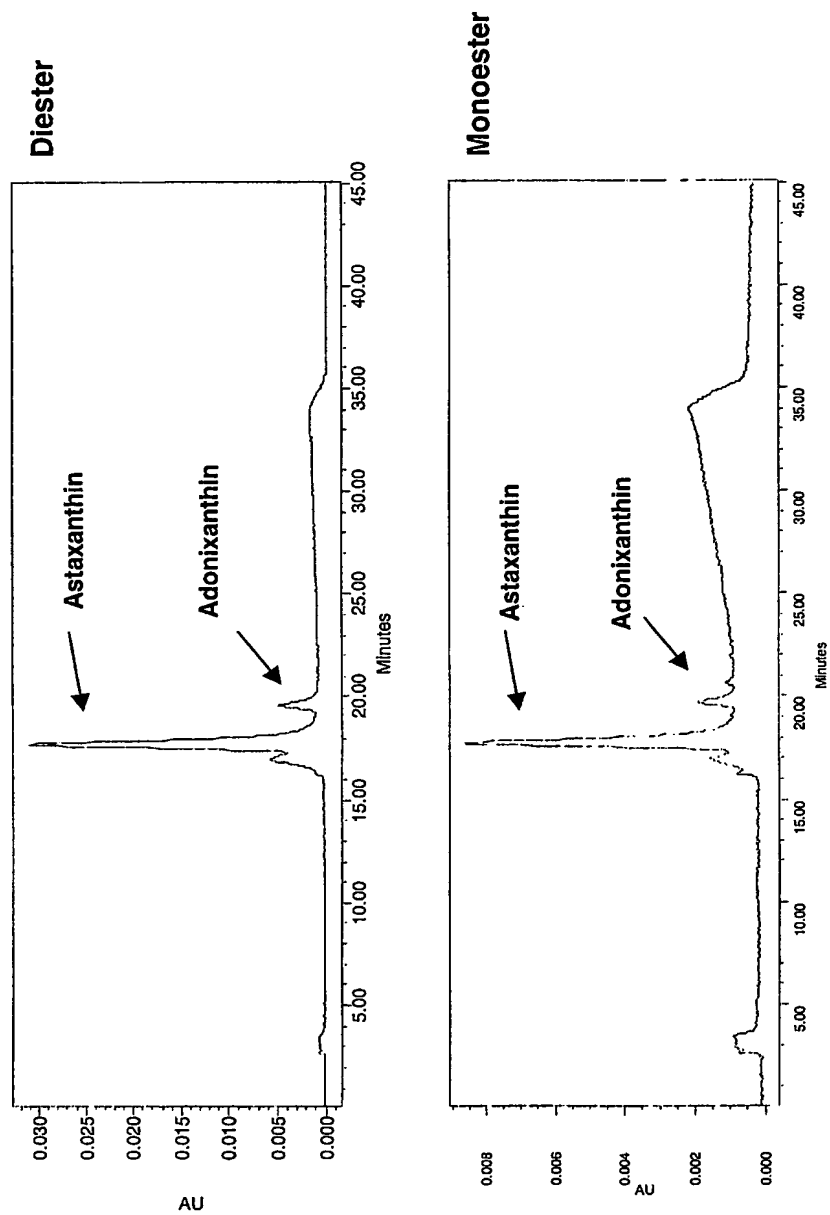
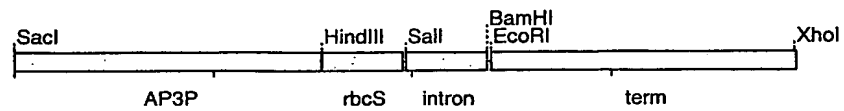


Abbildung 12: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*



pJA11 (1966 bps)

Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

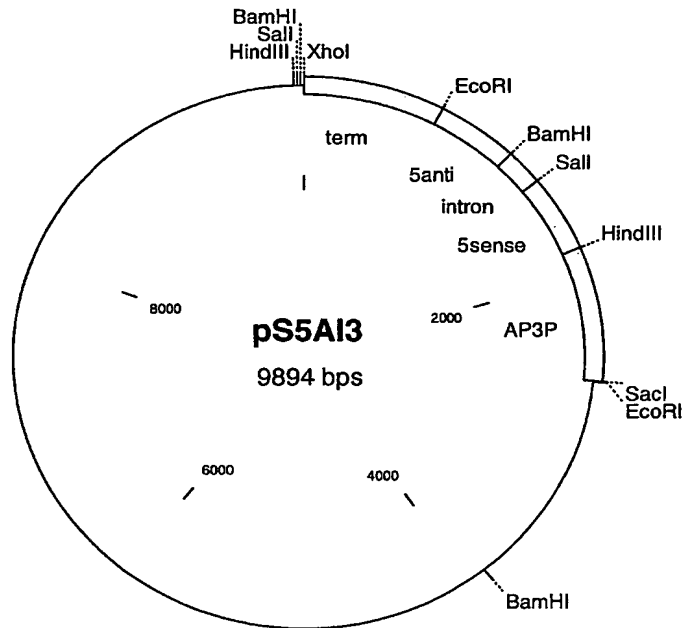


Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

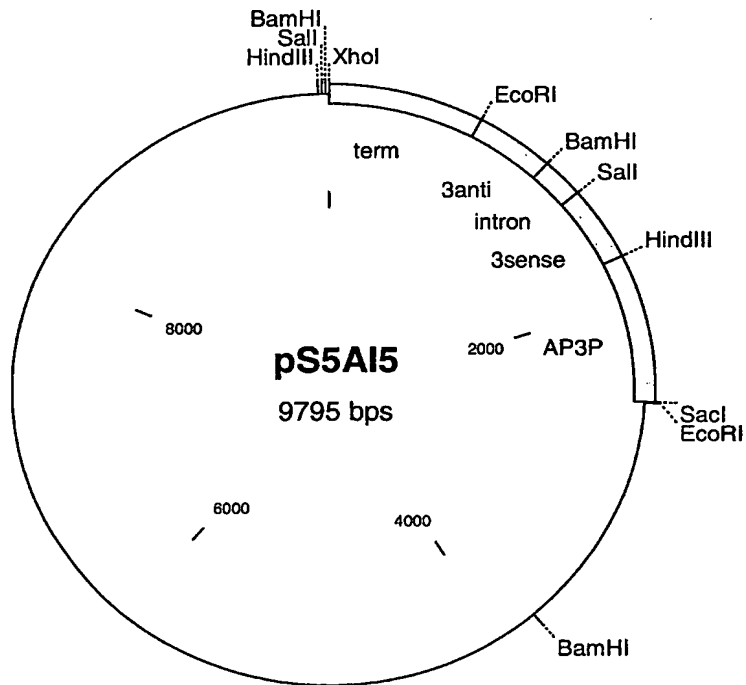
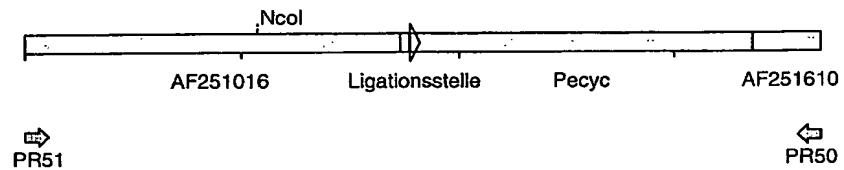


Abbildung 16: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält



ecycP-IPCR(734 bps)

Abbildung 17: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment
DES Epsilon-Cyclase Promoters enthält

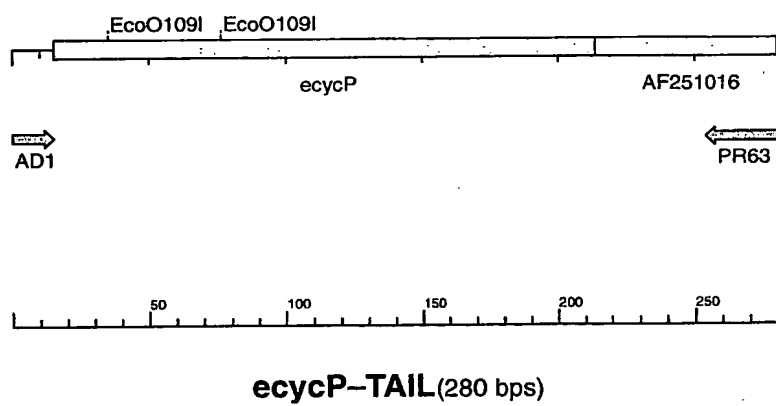


Abbildung 18: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

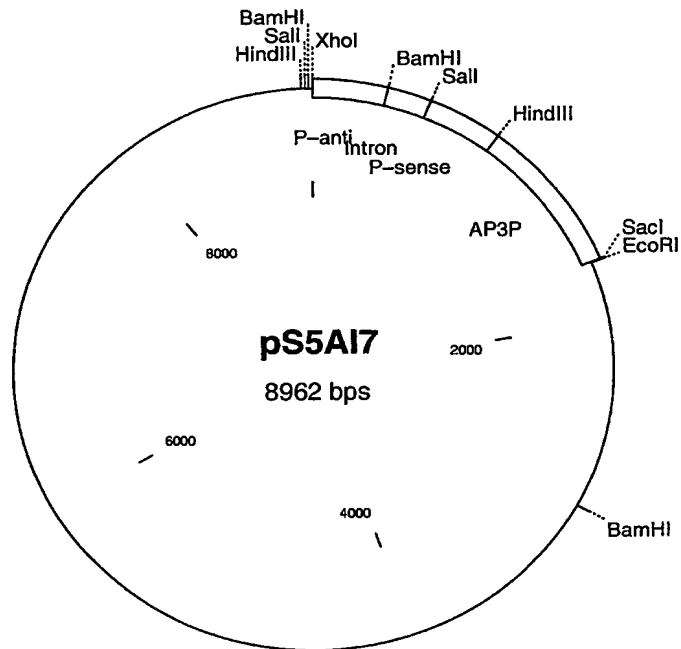


Abbildung 19: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

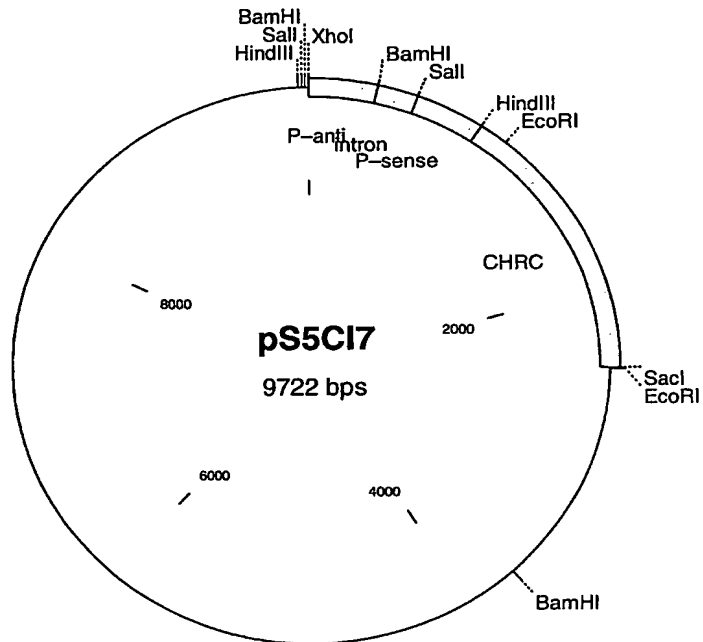


Abbildung 20: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters

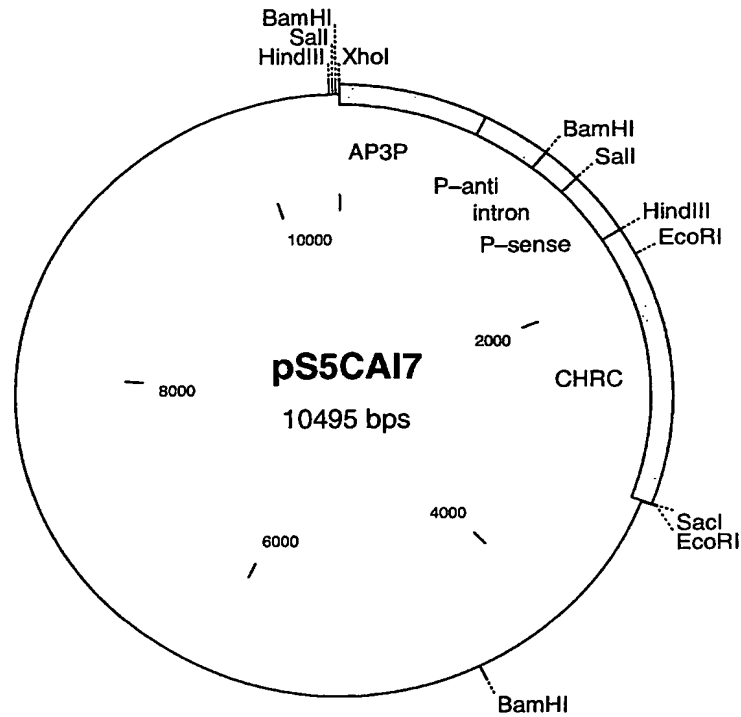


Abbildung 21: Konstrukt zur bluetenspezifischen Überexpression des Ketolase (β -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* ohne heterologes Transitpeptid.

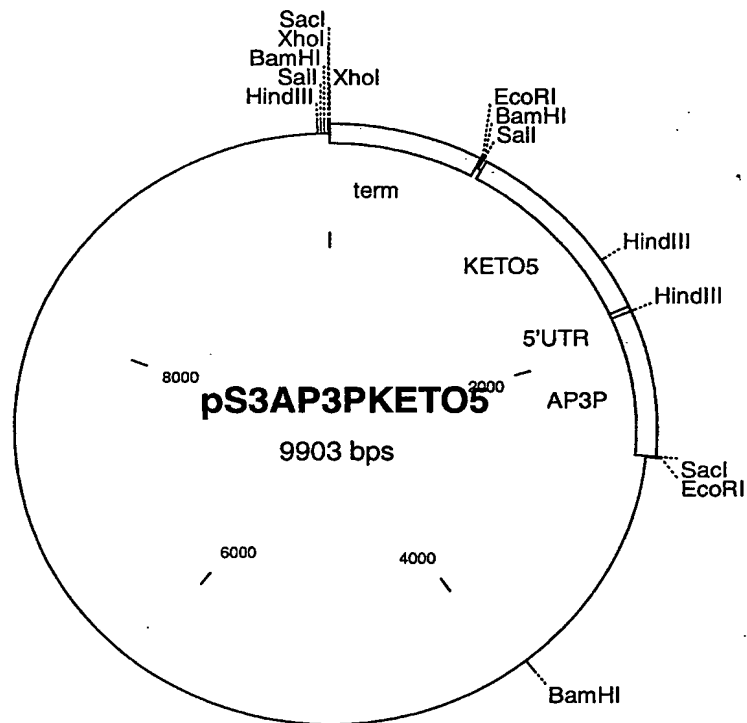
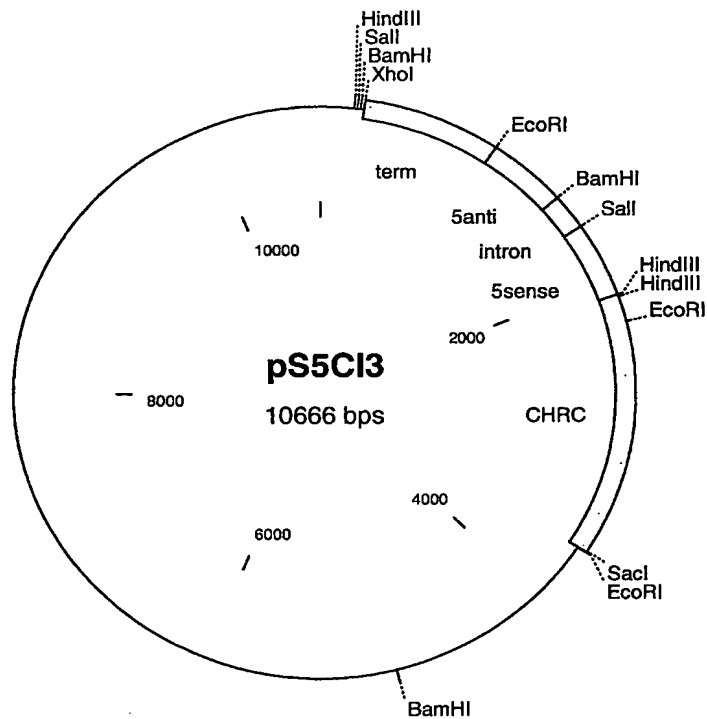


Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters



Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Blütenblättern
von Pflanzen

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung
von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen, die im
Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in
10 Blütenblättern aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen,
sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur
Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

15

20

25

30

35

40

45

1

SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH Co. KGaA

<120> Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin in Blueten von Pflanzen

<130> NAE 258/02

<160> 80

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1771

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1155)

<223>

<400> 1

ggcagcagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccgggtc cacagcctca 60

aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac 120

ccgcgagtct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca 177
Met Gln Leu Ala
1gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag 225
Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys
5 10 15 20gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg 273
Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp
25 30 35gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg 321
Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro
40 45 50gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc 369
Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile
55 60 65aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac 417
Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His
70 75 80gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg 465
Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp
85 90 95 100

ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc 513

2

Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser	
105 110 115	
ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca	561
Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr	
120 125 130	
ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg	609
Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met	
135 140 145	
aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg	657
Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu	
150 155 160	
tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac	705
Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His	
165 170 175 180	
cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga	753
His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly	
185 190 195	
aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg	801
Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met	
200 205 210	
tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag	849
Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln	
215 220 225	
ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg	897
Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala	
230 235 240	
ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc	945
Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro	
245 250 255 260	
cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg	993
His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met	
265 270 275	
aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt	1041
Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe	
280 285 290	
ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc	1089
Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro	
295 300 305	
ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga	1137
Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg	
310 315 320	
ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgccca	1185
Gly Leu Val Pro Ala	

3

325

gctgggcatg cagggttggg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg 1245
gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggagggggg tttgtagctg 1305
tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtgggtgcagg gagtacaccc acaggccaac 1365
acccttgcag gagatgtctt gcgtcgggag gagtgttggg cagtgtagat gctatgattg 1425
tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc 1485
aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcagggtg aagaggtgcg 1545
ggaggggtgt gccacacca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 1605
agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcacttat tctttgatat 1665
agatactggt caggcaggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725
ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tgggttcaaaa aaaaaa 1771

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

4

Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
325

5

<210> 3
 <211> 1662
 <212> DNA
 <213> Haematococcus pluvialis

<220>
 <221> CDS
 <222> (168)..(1130)
 <223>

<400> 3
 cggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga 60
 gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg 120
 ctccgtctctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc 176
 Met His Val
 1
 gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc 224
 Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser
 5 10 15
 agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc 272
 Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser
 20 25 30 35
 gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct 320
 Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro
 40 45 50
 cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc 368
 Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly
 55 60 65
 acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg 416
 Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro
 70 75 80
 aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc 464
 Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala
 85 90 95
 cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc 512
 Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe
 100 105 110 115
 att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac 560
 Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp
 120 125 130
 gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc 608
 Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu
 135 140 145
 ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg 656

6

Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met	
150 155 160	
ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg	704
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly	
165 170 175	
aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc	752
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe	
180 185 190 195	
gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg	800
Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu	
200 205 210	
gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat	848
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn	
215 220 225	
ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc	896
Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu	
230 235 240	
ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca	944
Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala	
245 250 255	
gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca	992
Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala	
260 265 270 275	
tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg	1040
Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp	
280 285 290	
gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc	1088
Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys	
295 300 305	
cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga	1130
Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala	
310 315 320	
cctggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc	1190
ggccagtggc agcgagtgct actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccaactgagca	1250
ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg	1310
ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga	1370
tgcattcagt agcgggtggc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggtttaggca	1430
gccggcattt gagagggcta agttataaat cgcattgctgc tcatggcgac atatctgcac	1490
acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt	1550

7

gttttattca gcagcagtag ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgagt 1610
gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

<210> 4
<211> 320
<212> PRT
<213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His
20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala
35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr
50 55 60

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile
65 70 75 80

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu
85 90 95

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala
100 105 110

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr
115 120 125

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu
130 135 140

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp
145 150 155 160

Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly
165 170 175

Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val

8

180

185

190

Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe
195 200 205

Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro
210 215 220

Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala
225 230 235 240

Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro
245 250 255

Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr
260 265 270

Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp
275 280 285

Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu
290 295 300

Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala
305 310 315 320

<210> 5

<211> 729

<212> DNA

<213> Agrobacterium aurantiacum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 5

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15

atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30

gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca 144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala

9

35	40	45	
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg			192
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala			
50	55	60	
cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat			240
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn			
65	70	75	80
gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg			288
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp			
85	90	95	
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc			336
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr			
100	105	110	
gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc			384
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala			
115	120	125	
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc			432
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro			
130	135	140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac			480
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr			
145	150	155	160
gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc			528
Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe			
165	170	175	
gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg			576
Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro			
180	185	190	
gac cgc cac aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg			624
Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu			
195	200	205	
ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac			672
Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His			
210	215	220	
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac			720
Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp			
225	230	235	240
acc gca tga			729
Thr Ala			

<210> 6

<211> 242

10

<212> PRT

<213> Agrobacterium aurantiacum

<400> 6

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala
35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
195 200 205

11

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
225 230 235 240

Thr Ala

<210> 7
<211> 1631
<212> DNA
<213> *Alcaligenes* sp.

<220>
<221> CDS
<222> (99) .. (827)
<223>

<400> 7
ctgcaggccg ggcccgtg ccaatggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60
ccggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116
Met Ser Gly Arg Lys Pro
1 5
ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164
Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile
10 15 20
ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212
Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp
25 30 35
gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260
Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr
40 45 50
tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308
Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly
55 60 65 70
tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg 356
Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu
75 80 85
gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tgc tgg ccc aag ctg atc gcc aag 404
Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys
90 95 100
cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc 452
His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe
105 110 115

12

ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat 500
Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr
120 125 130

ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat 548
Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr
135 140 145 150

gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc 596
Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val
155 160 165

ccg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg 644
Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu
170 175 180

ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac ccg cac aac gcg agg 692
Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg
185 190 195

tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc 740
Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe
200 205 210

ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg 788
Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp
215 220 225 230

cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct 837
Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala
235 240

cattgtcgtg gcgacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat 897

tatgcacggc ccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc 957

gttggaagaag aacgacctct acggcgctcgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttcac 1017

cgtgggcgcc tattggtggc cgggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cgggtctatgg 1077

gttgatctat ttcacctcgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcggtatat 1137

tccgcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgctgcacc acgcggctga 1197

ggggcgggac cactgcgtca gcttcggctt catctatgcc ccaccgtgg acaagctgaa 1257

gcaggatctg aagcggctcg gtgtcctcgc ccccaggac gagcgctccgt cgtgatctct 1317

gatcccgcg tggccgcatg aaatccgacg tgctgctggc aggggcggc cttgccaacg 1377

gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccacct tcgcgtgctg ctgctggacc 1437

gtgcggcggg cgctcggac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc 1497

actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcggt 1557

13

tcccagacca ttgcggaagg ctccggggccg gatatggctc gatcgacggg cgggggctga 1617
tgcggtgcggt gacc 1631

<210> 8
<211> 242
<212> PRT
<213> Alcaligenes sp.

<400> 8

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu
1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe
20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu
35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr
100 105 110

Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly
115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro

14

180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220

Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly
225 230 235 240

Arg Ala

<210> 9
<211> 729
<212> DNA
<213> *Paracoccus marcusii*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(729)
<223>

<400> 9
atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15

atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30

gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala
35 40 45

aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60

cat gac gcg atg cac ggg tcg gtc gtg cgg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80

gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95

cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr

15

100	105	110	
gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc			384
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala			
115	120	125	
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc			432
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro			
130	135	140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tac			480
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr			
145	150	155	160
gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc			528
Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe			
165	170	175	
gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg			576
Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro			
180	185	190	
gac cgc cat aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac cct gtg tcg ctg			624
Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu			
195	200	205	
ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac			672
Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His			
210	215	220	
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac			720
Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp			
225	230	235	240
acc gca tga			729
Thr Ala			

<210> 10
<211> 242
<212> PRT
<213> Paracoccus marcusii

<400> 10

Met	Ser	Ala	His	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu
1				5					10					15	

Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Leu	His	Val	His
			20				25						30		

Ala	Leu	Trp	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Ile	Leu	Ala	Val	Ala
			35				40					45			

16

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
225 230 235 240

Thr Ala

<210> 11

<211> 1629

<212> DNA

<213> Synechococcus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1629)
<223>

<400> 11
atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta 48
Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
1 5 10 15
gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta 96
Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
20 25 30
gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg 144
Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met
35 40 45
ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac 192
Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His
50 55 60
gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag 240
Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln
65 70 75 80
tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg 288
Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly
85 90 95
ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt 336
Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys
100 105 110
gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa 384
Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln
115 120 125
ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt 432
Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe
130 135 140
aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg 480
Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp
145 150 155 160
gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg 528
Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala
165 170 175
ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat 576
Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn
180 185 190
gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt 624

18

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys
195 200 205

tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg 672
Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met
210 215 220

atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga 720
Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly
225 230 235 240

ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa 768
Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln
245 250 255

ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa 816
Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu
260 265 270

aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg 864
Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg
275 280 285

gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg 912
Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu
290 295 300

caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg 960
Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly
305 310 315 320

gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa 1008
Glu Arg Leu Glu Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys
325 330 335

atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg 1056
Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly
340 345 350

ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat 1104
Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His
355 360 365

gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct 1152
Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala
370 375 380

aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg 1200
Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met
385 390 395 400

gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac 1248
Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr
405 410 415

cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc 1296
Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr

19

420	425	430	
gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg			1344
Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr			
435	440	445	
gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa			1392
Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu			
450	455	460	
agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc			1440
Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val			
465	470	475	480
tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta			1488
Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu			
485	490	495	
ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca			1536
Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr			
500	505	510	
ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga			1584
Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg			
515	520	525	
aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa			1629
Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp			
530	535	540	

<210> 12
<211> 542
<212> PRT
<213> Synechococcus sp.

<400> 12

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu	
1 5 10 15	

Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu	
20 25 30	

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met	
35 40 45	

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His	
50 55 60	

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln	
65 70 75 80	

20

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly
85 90 95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys
100 105 110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln
115 120 125

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe
130 135 140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp
145 150 155 160

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala
165 170 175

Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn
180 185 190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys
195 200 205

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met
210 215 220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly
225 230 235 240

Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln
245 250 255

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu
260 265 270

Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg
275 280 285

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu
290 295 300

21

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly
305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys
325 330 335

Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly
340 345 350

Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His
355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala
370 375 380

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met
385 390 395 400

Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr
405 410 415

Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr
420 425 430

Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr
435 440 445

Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu
450 455 460

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val
465 470 475 480

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu
485 490 495

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr
500 505 510

Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg
515 520 525

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp

22

530

535

540

<210> 13
<211> 776
<212> DNA
<213> Bradyrhizobium sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)
<223>

<400> 13
atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48
Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg
1 5 10 15
gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96
Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile
20 25 30
atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144
Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro
35 40 45
ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192
Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln
50 55 60
acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240
Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His
65 70 75 80
ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288
Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln
85 90 95
ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336
Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val
100 105 110
gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384
Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp
115 120 125
ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt 432
Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
130 135 140
ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc 480
Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
145 150 155 160
tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg 528
Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu

23

165	170	175	
ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tcg gcg ctg cag ctg ttc acc			576
Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr			
180	185	190	
ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat			624
Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp			
195	200	205	
cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tcg ctg ctg			672
Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu			
210	215	220	
acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat			720
Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp			
225	230	235	240
gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag cgg cgg gcc ctg gaa agg			768
Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg			
245	250	255	
cgt gac ta			776
Arg Asp			

<210> 14
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Bradyrhizobium sp.

<400> 14

Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg	
1	15

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile	
20	30

Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro	
35	45

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln	
50	60

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His	
65	80

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln	
85	95

24

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val
100 105 110

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp
115 120 125

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu
165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr
180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp
195 200 205

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp
225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg
245 250 255

Arg Asp

<210> 15
<211> 777
<212> DNA
<213> Nostoc sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(777)
<223>

<400> 15

25

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta	48
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu	
1 5 10 15	
ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt	96
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe	
20 25 30	
att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta	144
Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu	
35 40 45	
ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc	192
Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	
50 55 60	
atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat	240
Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	
65 70 75 80	
gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat	288
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn	
85 90 95	
ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa	336
Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	
100 105 110	
gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat	384
Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	
115 120 125	
tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg	432
Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	
130 135 140	
tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga	480
Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	
145 150 155 160	
tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa	528
Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	
165 170 175	
aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta	576
Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	
180 185 190	
caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt	624
Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	
195 200 205	
ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt	672
Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	
210 215 220	
tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac	720

26

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
225 230 235 240

gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata 768
Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
245 250 255

tct tta taa 777
Ser Leu

<210> 16
<211> 258
<212> PRT
<213> Nostoc sp.

<400> 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu
35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala
50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His
65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn
85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys
100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp
115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp
130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly
145 150 155 160

Ser Leu

```
<220>
<221> CDS
<222> (3) .. (971)
<223>
```

[illegible]

28

tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly 65 70 75	239
acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala 80 85 90 95	287
ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys 100 105 110	335
cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly 115 120 125	383
gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His 130 135 140	431
atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu 145 150 155	479
ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr 160 165 170 175	527
gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His 180 185 190	575
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu 195 200 205	623
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly 210 215 220	671
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu 225 230 235	719
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu 240 245 250 255	767
gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met 260 265 270	815
aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly 275 280 285	863

29

ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att 911
Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile
290 295 300

cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg 959
Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp
305 310 315

tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg 1011
Ser Lys Arg
320

tgataagggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggctg actggtctga 1071

tggccaatgg catcggccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaagggtgatg 1131

cacatcatca tgtgcgggtg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc 1191

caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcgggt tgtgaagcaa tgactccgcc 1251

catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta 1311

gtgcagcaaa ctatattcac ctagggtgtg ttgtaggatac aggtgaggcc ttgcacattg 1371

catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc 1431

agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga 1491

ggctcgtgcc agaaatgggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 1551

tgcaactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1608

<210> 18

<211> 322

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 18

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
50 55 60

Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr

30

65

70

75

80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu
85 90 95

Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
115 120 125

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
130 135 140

Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
145 150 155 160

Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
165 170 175

His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
195 200 205

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe
210 215 220

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly
225 230 235 240

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val
245 250 255

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys
260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly
275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro
290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser
305 310 315 320

Lys Arg

<210> 19
<211> 1503
<212> DNA
<213> Tomate

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1503)
<223>

<400> 19
atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca 48
Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
1 5 10 15

cat cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat 96
His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
20 25 30

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt 144
His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
35 40 45

tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc 192
Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
50 55 60

aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa 240
Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
65 70 75 80

ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt 288
Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
85 90 95

gct gtt gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att 336
Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
100 105 110

gat ccg aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg 384
Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
115 120 125

gat gaa ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg 432
Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
130 135 140

32

tct ggt gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat	480
Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His	
145 150 155 160	
aga cct tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg	528
Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met	
165 170 175	
cag aaa tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata	576
Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile	
180 185 190	
aag gtg att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt	624
Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly	
195 200 205	
att act att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga	672
Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg	
210 215 220	
tct ctt gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct	720
Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala	
225 230 235 240	
tat ggc att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag	768
Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys	
245 250 255	
atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat	816
Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp	
260 265 270	
ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca	864
Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
275 280 285	
ttt tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt	912
Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg	
290 295 300	
cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta	960
Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu	
305 310 315 320	
aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt	1008
Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys	
325 330 335	
cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt	1056
Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val	
340 345 350	
gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg	1104
Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met	
355 360 365	

33

gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att 1152
Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile
370 375 380

caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca 1200
Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr
385 390 395 400

gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag 1248
Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu
405 410 415

ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct 1296
Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala
420 425 430

aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg 1344
Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp
435 440 445

cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt 1392
His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe
450 455 460

ggg ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata 1440
Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile
465 470 475 480

atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta 1488
Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu
485 490 495

cag gat aaa gaa tga 1503
Gln Asp Lys Glu
500

<210> 20
<211> 500
<212> PRT
<213> Tomato

<400> 20

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
1 5 10 15

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
20 25 30

His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
35 40 45

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr

34

50

55

60

Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
65 70 75 80

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
85 90 95

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
130 135 140

Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His
145 150 155 160

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met
165 170 175

Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile
180 185 190

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly
195 200 205

Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg
210 215 220

Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala
225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys
245 250 255

Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp
260 265 270

Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro
275 280 285

35

Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg
290 295 300

Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu
305 310 315 320

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys
325 330 335

Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val
340 345 350

Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met
355 360 365

Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile
370 375 380

Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr
385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu
405 410 415

Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala
420 425 430

Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp
435 440 445

His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe
450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile
465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu
485 490 495

Gln Asp Lys Glu
500

<210> 21
<211> 195
<212> DNA
<213> Kartoffel

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(195)
<223>

<400> 21
tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60
atataatatt tcaaataattt tttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120
ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180
gttgatgtgc agctg 195

<210> 22
<211> 1155
<212> DNA
<213> Haematococcus pluvialis

<220>
<221> CDS
<222> (6)..(995)
<223>

<400> 22
gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser
1 5 10 15

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98
Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp
20 25 30

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146
Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser
35 40 45

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194
Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser
50 55 60

gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc 242
Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala
65 70 75

gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg 290
Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu
80 85 90 95

37

gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val 100 105 110	338
agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu 115 120 125	386
gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His 130 135 140	434
ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg 145 150 155	482
gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg 160 165 170 175	530
aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro 180 185 190	578
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe 195 200 205	626
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp 210 215 220	674
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val 225 230 235	722
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe 240 245 250 255	770
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser 260 265 270	818
tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser 275 280 285	866
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu 290 295 300	914
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg 305 310 315	962

38

cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcaagtgggc 1015
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
320 325

cctgctgccca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc 1075

gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg 1135

ttttagctg tcgagcttgc 1155

<210> 23

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

39

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
325

<210> 24
<211> 1111
<212> DNA
<213> Haematococcus pluvialis

<220>
<221> CDS
<222> (4)..(951)
<223>

<400> 24

40

tgc atg cta gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc	48
Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser	
1 5 10 15	
tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa	96
Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu	
20 25 30	
gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca	144
Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro	
35 40 45	
cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc	192
Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser	
50 55 60	
tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc	240
Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr	
65 70 75	
tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag	288
Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln	
80 85 90 95	
ctg gtt agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt	336
Leu Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe	
100 105 110	
gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct	384
Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala	
115 120 125	
atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg	432
Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu	
130 135 140	
ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg	480
Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu	
145 150 155	
cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag	528
His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys	
160 165 170 175	
gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc	576
Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala	
180 185 190	
agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca	624
Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala	
195 200 205	
tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg	672
Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu	
210 215 220	
ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc	720

41

Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe
 225 230 235
 tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca 768
 Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser
 240 245 250 255
 ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag 816
 Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln
 260 265 270
 gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac 864
 Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His
 275 280 285
 tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac 912
 Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn
 290 295 300
 tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac 961
 Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
 305 310 315
 tgcagtgggc cctgctgccca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa 1021
 agctgcaggc gctgctgccg gacacgttgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta 1081
 ggggagggggg tttgtagctg tcgagcttgc 1111

<210> 25
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu
 20 25 30

Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro
 35 40 45

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp
 50 55 60

Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser
 65 70 75 80

42

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu
85 90 95

Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val
100 105 110

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met
115 120 125

His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly
130 135 140

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His
145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp
165 170 175

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser
180 185 190

Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp
195 200 205

Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu
210 215 220

Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr
225 230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly
245 250 255

Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala
260 265 270

Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp
275 280 285

Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys
290 295 300

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala

43

305

310

315

<210> 26
<211> 1031
<212> DNA
<213> Haematococcus pluvialis

<220>
<221> CDS
<222> (6)..(1031)
<223>

<400> 26
gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser
1 5 10 15

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98
Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp
20 25 30

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146
Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser
35 40 45

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194
Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser
50 55 60

gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gct 242
Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala
65 70 75

gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg 290
Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu
80 85 90 95

gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt 338
Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val
100 105 110

agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg 386
Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu
115 120 125

gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat 434
Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His
130 135 140

ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga 482
Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg
145 150 155

gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc 530
Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg

44

160	165	170	175	
aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct				578
Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro				
	180	185	190	
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc				626
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe				
	195	200	205	
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg				674
Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp				
	210	215	220	
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg				722
Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val				
	225	230	235	
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt				770
Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe				
	240	245	250	255
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct				818
Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser				
	260	265	270	
tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc				866
Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser				
	275	280	285	
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag				914
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu				
	290	295	300	
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc				962
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg				
	305	310	315	
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca				1010
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser				
	320	325	330	335
gaa gag gat ctg aat agc tag				1031
Glu Glu Asp Leu Asn Ser				
	340			

<210> 27
<211> 341
<212> PRT
<213> Haematococcus pluvialis

<400> 27

Met	Gln	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Ser	Ala
1							5						10		15

45

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

46

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
325 330 335

Glu Asp Leu Asn Ser
340

<210> 28
<211> 777
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(777)
<223>

<400> 28
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactgggtcga 120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240
ggggtaatat tctatttttcc aaggatcttt agttaaggc aaatccggga aattattgta 300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360
tatatatctc tttcttctta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttta 420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgcga 480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgcggtt aagtcgatgt 540

47

ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600
tcacttagtt ttcataact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660
ttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaata tcttcaacaa aaagctt 777

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(22)
<223>

<400> 29
gcaagctcga cagctacaaa cc 22

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(24)
<223>

<400> 30
gaagcatgca gctagcagcg acag 24

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(30)
<223>

<400> 31
tgcattgctag aggcaactcaa ggagaaggag 30

<210> 32
<211> 59

48

<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(59)
<223>

<400> 32
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc 59

<210> 33
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 33
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 34
<211> 37
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(37)
<223>

<400> 34
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 35
<211> 34
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(34)
<223>

<400> 35
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34

<210> 36
<211> 25
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(25)
<223>

<400> 36
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 37
<211> 212
<212> DNA
<213> Kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(212)
<223>

<400> 37
gtcgactacg taagtttctg cttctacott tgatatatat ataataatta tcattaatta 60
gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 180
aaatttggtg atgtgcaggt atcaccggat cc 212

<210> 38
<211> 1830
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> CDS
<222> (141)..(1691)
<223>

<400> 38
ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60
gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120
agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr
1 5 10

50

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg	221
Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr	
15 20 25	
aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa	269
Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln	
30 35 40	
gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tgc gag ctg	317
Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu	
45 50 55	
ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc	365
Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser	
60 65 70 75	
cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt	413
Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser	
80 85 90	
aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt	461
Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu	
95 100 105	
gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc	509
Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile	
110 115 120	
ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa	557
Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu	
125 130 135	
ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat	605
Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp	
140 145 150 155	
act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc	653
Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala	
160 165 170	
tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg	701
Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg	
175 180 185	
tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att	749
Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile	
190 195 200	
act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc	797
Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile	
205 210 215	
aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga	845
Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly	
220 225 230 235	
aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893

51

Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr	
				240					245					250		
gct	tat	ggt	ata	gag	gtt	gag	gtt	gaa	agc	ata	ccc	tat	gat	cca	agc	941
Ala	Tyr	Gly	Ile	Glu	Val	Glu	Val	Glu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Asp	Pro	Ser	
			255					260					265			
cta	atg	gtt	ttc	atg	gat	tat	aga	gac	tac	acc	aaa	cat	aaa	tct	caa	989
Leu	Met	Val	Phe	Met	Asp	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Lys	His	Lys	Ser	Gln	
		270					275					280				
tca	cta	gaa	gca	caa	tat	cca	aca	ttt	ttg	tat	gtc	atg	cca	atg	tct	1037
Ser	Leu	Glu	Ala	Gln	Tyr	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Met	Pro	Met	Ser	
		285					290				295					
cca	act	aaa	gta	ttc	ttt	gag	gaa	act	tgt	ttg	gct	tca	aaa	gag	gcc	1085
Pro	Thr	Lys	Val	Phe	Phe	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Ala	
300					305				310					315		
atg	cct	ttt	gag	tta	ttg	aag	aca	aaa	ctc	atg	tca	aga	tta	aag	act	1133
Met	Pro	Phe	Glu	Leu	Leu	Lys	Thr	Lys	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Thr	
			320						325					330		
atg	ggg	atc	cga	ata	acc	aaa	act	tat	gaa	gag	gaa	tgg	tca	tat	att	1181
Met	Gly	Ile	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	
			335					340					345			
cca	gta	ggt	gga	tcc	tta	cca	aat	acc	gag	caa	aag	aac	ctt	gca	ttt	1229
Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Asn	Thr	Glu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala	Phe	
		350					355					360				
ggt	gct	gct	gct	agc	atg	gtg	cat	cca	gcc	aca	gga	tat	tcg	gtt	gta	1277
Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	Val	His	Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ser	Val	Val	
		365				370					375					
aga	tca	ctg	tca	gaa	gct	cct	aat	tat	gca	gca	gta	att	gca	aag	att	1325
Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ala	Ala	Val	Ile	Ala	Lys	Ile	
380					385				390					395		
tta	ggg	aaa	gga	aat	tca	aaa	cag	atg	ctt	gat	cat	gga	aga	tac	aca	1373
Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	Ser	Lys	Gln	Met	Leu	Asp	His	Gly	Arg	Tyr	Thr	
				400					405					410		
acc	aac	atc	tca	aag	caa	gct	tgg	gaa	aca	ctt	tgg	ccc	ctt	gaa	agg	1421
Thr	Asn	Ile	Ser	Lys	Gln	Ala	Trp	Glu	Thr	Leu	Trp	Pro	Leu	Glu	Arg	
			415				420						425			
aaa	aga	cag	aga	gca	ttc	ttt	ctc	ttt	gga	tta	gca	ctg	att	gtc	cag	1469
Lys	Arg	Gln	Arg	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Val	Gln	
		430					435					440				
atg	gat	att	gag	ggg	acc	cgc	aca	ttc	ttc	cgg	act	ttc	ttc	cgc	ttg	1517
Met	Asp	Ile	Glu	Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Leu	
		445					450				455					
ccc	aca	tgg	atg	tgg	tgg	ggg	ttt	ctt	gga	tct	tcg	tta	tca	tca	act	1565
Pro	Thr	Trp	Met	Trp	Trp	Gly	Phe	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	

52

460 465 470 475
gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613
Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser
 480 485 490
ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661
Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly
 495 500 505
aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcatcag 1711
Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile
 510 515
tttagattat aggcacatct tgcataatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771
tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg 1830

<210> 39
<211> 516
<212> PRT
<213> Tagetes erecta

<400> 39

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr
1 5 10 15

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys
20 25 30

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu
35 40 45

Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met
50 55 60

Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu
65 70 75 80

Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp
85 90 95

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu
100 105 110

Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro
115 120 125

53

Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly
130 135 140

Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu
145 150 155 160

Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser
165 170 175

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly
180 185 190

Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn
195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg
210 215 220

Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr
225 230 235 240

Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu
245 250 255

Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met
260 265 270

Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln
275 280 285

Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe
290 295 300

Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu
305 310 315 320

Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile
325 330 335

Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser
340 345 350

54

Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser
355 360 365

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu
370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn
385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys
405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala
420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly
435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp
450 455 460

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe
465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu
485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala
500 505 510

Tyr Leu Thr Ile
515

<210> 40
<211> 445
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> Sense Fragment
<222> (1)..(445)
<223>

<400> 40
aagcttgac gaggcaaagc aaaggttggt tggtggtggt gttgagagac actccaatcc

60

55

aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggtc ctaacaacag caacgaagaa 120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180
ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaagcaa cagaataagt ccatggatgc 360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
ctgtatactg gatttggttg tcgac 445

<210> 41
<211> 446
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> Antisense Fragment
<222> (1)..(446)
<223>

<400> 41
gaattcgac gaggcaaagc aaaggttggt tggtgttggt gttgagagac actccaatcc 60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggtc ctaacaacag caacgaagaa 120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180
ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaagcaa cagaataagt ccatggatgc 360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
ctgtatactg gatttggttg gacct 446

<210> 42
<211> 393
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> Sense Fragment
<222> (1)..(393)
<223>

<400> 42

56

aagcttttga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggaccgcga cattcttccg 60
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtgggggttt ctgggatctt cgttatcatc 120
aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180
gggtctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240
cacgatataa ataactctag tcgcatcag tttagattat aggcacatct tgcataata 300
tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

<210> 43
<211> 397
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> Antisense Fragment
<222> (1)..(397)
<223>

<400> 43
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct 60
tccggacttt ctccgcttg ccacatgga tgtggtggg gtttcttga tcttcgttat 120
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180
gaatgggtct ggtagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240
atctcagat ataaataact ctagtcgga tcagtttaga ttataggcac atcttgcata 300
tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360
ttcttggggt aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397

<210> 44
<211> 1537
<212> DNA
<213> -

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(1537)
<223>

<400> 44
gagctctaca aattagggtt actttattca tttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcaatttct tattcatacc 120

tattcactca agcctttacc atcttccttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt 180
tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttagggatg cctaagtgtc 240
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300
aatacaaata aagtgaacaa aaatatctat aaataaacia atatatatat tttgttagac 360
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatattc tactttacct actaaatttg 420
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc 480
taaaccctat ttaaatagtc aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540
taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tatttattta aataaaaaag actaataaat 720
atataaaatg aatgttcata cgcagacca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780
gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840
aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960
cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggttt ctccacaagg tcaatagtca 1020
atattagggt ttattggact tttaatagta tcaaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140
cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgccctcacat gcttcgggtg gctcgtttta 1200
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta 1260
acaagccacg ttgcgtgcca ttgccaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320
acctccaaaa caacgacaag tttccgaaca gtgcggaaga tcaagggat aatcgtcttt 1380
ttgaattcta tttctcttta tttaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440
taaaacgtag ctgctgttta agtaaataccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500
gtttctctga tttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

<210> 45
<211> 734
<212> DNA
<213> Kuenstliche Sequenz

<220>
<221> variation

58

<222> (1)..(734)

<223>

<400> 45

ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc 60
cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc 120
cagctagtgc ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cgggtggatgc 180
gagctgcttt ttgttcaaat gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc 240
caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat 300
gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa gggctcttacc 360
gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggagggtg ggggattata ggctttgttg 420
tgagaatggt gagaaagagg tttgacaaat cgggtgtttga atgagggttaa atggagttta 480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggatgatggg gatattaaag acggscaata 540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggttaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct 600
tggtctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta 660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa 720
acagatacaa ggcg 734

<210> 46

<211> 280

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> variation

<222> (1)..(280)

<223>

<400> 46

gtcagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat 60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaac acatacaacg 120
tggttttaaa agatggcttg gctgctaata aactcaactc aactcatatc ctatccattc 180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggtgt ttgttggtgt 240
tgttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga 280

<210> 47

<211> 358

59

<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> Sense Promotor
<222> (1)..(358)
<223>

<400> 47
aagcttaccg atagtaaaat cgttagttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60
gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgagggttaa 120
tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180
cggccaatat agtgatgcc a gtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa 240
aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300
tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggtt tttgttgttg ttgtcgac 358

<210> 48
<211> 361
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> Antisense Promotor
<222> (1)..(361)
<223>

<400> 48
ctcgagctta ccgatatga aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60
taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgaggtt 120
aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gagggatgag gggatattaa 180
agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240
taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca tatcctatcc attcaaattc 300
aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgatc 360
c 361

<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer

60

<222> (1)..(28)
<223>

<400> 49
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 50
<211> 37
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(37)
<223>

<400> 50
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 51
<211> 34
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(34)
<223>

<400> 51
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 52
<211> 25
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(25)
<223>

<400> 52
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 53
<211> 23
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

61

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(23)
<223>

<400> 53
gaaaataactt catcagcatt acc

23

<210> 54
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 54
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

<400> 55
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 56
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 56
aagcttgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 57

62

<211> 29
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(29)
<223>

<400> 57
gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 58
<211> 30
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(30)
<223>

<400> 58
aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 59
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 59
gaattcgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 60
<211> 25
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(25)
<223>

<400> 60
aagctttgga ttagcactga ttgtc

25

<210> 61
<211> 29
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(29)
<223>

<400> 61
gtcgacagaa aatacttcac cagcattac

29

<210> 62
<211> 29
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(29)
<223>

<400> 62
ggatccagaa aatacttcac cagcattac

29

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(27)
<223>

<400> 63
gaattctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 64
<211> 23
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(23)
<223>

64

<400> 64
cgccttgat ctgtttggat tgg 23

<210> 65
<211> 24
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(24)
<223>

<400> 65
ctaacaatca atgagtatga gagc 24

<210> 66
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

<400> 66
agagcaaggc cagcaggacc acaacc 26

<210> 67
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

<400> 67
ccttgggagc ttttgggata ggctag 26

<210> 68
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer

65

<222> (1)..(26)
<223>

<400> 68
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

<210> 69
<211> 15
<212> DNA
<213> .kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(15)
<223>

<400> 69
gtcgagtatg gagtt

15

<210> 70
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 70
aagcttaccg atagtaaaat cgttagtt

28

<210> 71
<211> 31
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(31)
<223>

<400> 71
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt t

31

<210> 72
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<400> 72
gtcgacaaca acaacaaca acctttgc

28

<210> 73
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 73
ggatccaaca acaacaaca acctttgc

28

<210> 74
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 74
gtcgactttt tgttgaagag atttggtg

28

<210> 75
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 75
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 76
<211> 22
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer

67

<222> (1)..(22)
<223>

<400> 76
gagctctaca aattaggggtt ac 22

<210> 77
<211> 23
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(23)
<223>

<400> 77
aagcttatta tttccaaatt ccg 23

<210> 78
<211> 50
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(50)
<223>

<400> 78
aagctttgca attcatacag aagtgagaaa aatgcagcta gcagcgacag 50

<210> 79
<211> 1062
<212> DNA
<213> Haematococcus pluvialis

<220>
<221> CDS
<222> (32)..(1021)
<223>

<400> 79
aagctttgca attcatacag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta 52
Met Gln Leu Ala Thr Val
1 5

atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag 100
Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu
10 15 20

68

aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag	148
Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln	
25 30 35	
tac tcg ctt ccg tca gag gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag	196
Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys	
40 45 50 55	
aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg	244
Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala	
60 65 70	
cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt	292
Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe	
75 80 85	
caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg	340
Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val	
90 95 100	
tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc agc agc agc ctg ctg cac	388
Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His	
105 110 115	
atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt	436
Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe	
120 125 130 135	
atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg	484
Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg	
140 145 150	
cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg	532
Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp	
155 160 165	
ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac	580
Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His	
170 175 180	
act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc	628
Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly	
185 190 195	
att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg	676
Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp	
200 205 210 215	
cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt	724
Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly	
220 225 230	
gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg	772
Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu	
235 240 245	

69

tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct 820
 Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro
 250 255 260

gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg 868
 Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp
 265 270 275

aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc 916
 Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys
 280 285 290 295

tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc 964
 Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro
 300 305 310

tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val
 315 320 325

cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca gctgggcatg c 1062
 Pro Ala

<210> 80
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 80

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser

70

100

105

110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
325

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.